Untersuchungen zu Entwicklung und Eigenschaften von Lipasen und Glyoxysomen in reifenden und keimenden Ölsamen

Anton Fußeder

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547028_0027

Untersuchungen zu Entwicklung und Eigenschaften von Lipasen und Glyoxysomen in reifenden und keimenden Ölsamen

Dissertation

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Anton Fußeder

aus Vilsbiburg

April 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.R.R.Theimer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.1981

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite:
A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	9
1.	Pflanzenmaterial	9
2.	Anzuchtmethode	9
3.	Herstellung von Gewebehomogenaten	9
4.	Fraktionierung des Rohhomogenats	10
4.1.	Differentielle Zentrifugation	10
4.2.	Zentrifugation im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten	11
5.	Fraktionierung der Glyoxysomalfraktion	11
5.1.	Osmotische Lyse der Glyoxysomalfraktion	11
5.2.	Zentrifugation im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten	12
6.	Messung der Enzymaktivitäten	12
6.1.	Fumarase	13
6.2.	β-Oxydation der Fettsäuren	13
6.3.	β-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase	13
6.4.	β-Ketothiolase	14
6.5.	Glutamat-Oxalacetat-Amino-Transferase	14
6.6.	Glykolatoxidase	15
6.7.	Hydroxypyruvatreduktase	15
6.8.	Isocitratlyase	16
6.9.	Katalase	16

Seite:

6.10. Lipase 17
6.10.1. Fluorimetrische Testmethode 17
6.10.2. Colorimetrische Testmethode 17
6.10.2.1. Colorimetrische Testmethode mit p-Nitrophenyl-Fettsäureester als Substrat 17
6.10.2.2. Colorimetrische Testmethode mit Tri- und Monoglyceriden als Substrat 18
6.11. Malatsynthetase 19
6.12. Malatdehydrogenase 20
6.13. $NADH_2$-Cytochrom-c-Reductase 20

7. Bestimmung des Proteingehaltes 21

8. Bestimmung der Saccharosekonzentration ... 21

C. Ergebnisse 22

I. Entwicklung und Lokalisation der Lipaseaktivität in Kotyledonen von Raps und Sonnenblumen 22

1. Vorversuche zur Testmethode 22

2. Entwicklung der Lipaseaktivität im Verlauf von Reifung und Keimung 25

3. Intrazelluläre Lokalisation 27
3.1. Differentielle Zentrifugation der Rohhomogenate 27

3.2. Fraktionierung im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten 28

II. Eigenschaften der Lipasen 37

1. pH-Abhängigkeit 37

2. Substratselektivität 39

Seite:

3. Einfluß freier Fettsäuren auf die Lipaseaktivitäten 43

4. Apparente K_M-Werte 45

5. Effektoren der Lipaseaktivitäten..... 45

5.1. Einfluß von DTE und p-Chloromercuriphenylsulfonsäure auf die Lipaseaktivitäten 45

5.2. Einfluß von Salzen, EDTA und Triton X-100 auf die Lipaseaktivitäten 49

III. Entwicklung glyoxysomaler Enzymsysteme in den Kotyledonen von Raps und Sonnenblumen 51

1. Glyoxysomale Enzymausstattung in reifenden und ruhenden Sonnenblumensamen 51

2. Entwicklung glyoxysomaler Enzymsysteme während der Keimung im Dunkeln 60

2.1. Änderung der Gesamtaktivitäten 60

2.2. Änderung der Enzymausstattung in den Glyoxysomen 64

IV. Intrapartikuläre Lokalisation glyoxysomaler Enzymsysteme 74

1. Osmotische Lyse der Glyoxysomen 75

2. Festigkeit der Membranassoziation 85

D. Diskussion 89

E. Zusammenfassung 100

F. Literaturverzeichnis 104

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

CAT	= Katalase
CCR	= $NADH_2$-Cytochrom-c-Reduktase
DTE	= Dithioerythrit
EA	= Enzymaktivität
ER	= Endoplasmatisches Retikulum
FUM	= Fumarase
g FG	= Gramm Frischgewicht
HAD	= 3-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase
HPR	= Hydroxypyruvat-Reduktase
ICL	= Isocitratlyase
KP	= Kotyledonenpaar
Kt	= Keimtag
LIP	= Lipase
MDH	= Malatdehydrogenase
MIM	= N-Methylindoxylmyristat
MS	= Malatsynthetase
PCMBS	= p-Chloromercuriphenylsulfonsäure
p (Prot)	= Protein
Sacch	= Saccharose
SB	= Sonnenblumen
S_2	= Rohpartikelfraktion (23 000 x g Sediment)
SG	= Solubilisierungsgrad
Thiol	= ß-Ketothiolase
Trans	= Glutamat-Oxalacetat-Amino-Transferase
U_1	= Rohhomogenat
U_2	= Cytoplasmatische Fraktion (23 000 x g Überstand)

A. Einleitung

Während der Keimung von Ölsamen wird durch den schrittweisen Abbau der Triglyceride in freie Fettsäuren und Glycerin die Mobilisierung und der Umbau der Reservefette in Kohlenhydrate eingeleitet, die dem Keimling als Kohlenstoff- und Energiequelle zur Verfügung stehen (Stumpf, 1976). Diesen ersten Reaktionsschritt katalysiert das Enzym Lipase (Glycerolesterhydrolase E.C.3.1.1.3), welches sich von unspezifischen Esterasen durch seine Fähigkeit unterscheidet, bevorzugt wasserunlösliches, kolloiddispergiertes Substrat zu hydrolysieren (Brockerhoff und Jensen, 1974).

Entsprechend ihrer wichtigen biologischen Bedeutung sind Lipasen im Pflanzenreich weit verbreitet. Über deren Vorkommen in höheren Pflanzen liegen bereits eine Vielzahl von Befunden vor (Literaturhinweise s. Rosnitschek, 1977). Neuere Arbeiten berichten über das Vorkommen von Lipasen in den Kotyledonen von Cucumis melo (Akhtar und Kausar, 1978), Cucumeropsis edulis (Opute, 1975), Arachis hypogaea (Huang und Moreau, 1978, Sanders und Pattee, 1975), Brassica napus (Rosnitschek und Theimer, 1980; Theimer und Rosnitschek, 1978) und in den Keimlingen von Vicia faba (Dundas et al., 1978).

Der zellphysiologische Mechanismus des Abbaus von Reservefett, das in den Sphärosomen (Oleosomen oder Lipidbodies) gespeichert ist, ist bislang für die Kotyledonen von Brassica napus (Rosnitschek und Theimer, 1980; Theimer und Rosnitschek, 1978) und Arachis hypogaea (Huang und Moreau, 1978; Sanders und Pattee, 1975) sowie dem Ricinusendosperm (Muto und Beevers, 1974; Ory et al., 1960, 1962, 1968, 1969, 1971) näher untersucht worden. Während der Keimlingsentwicklung von Ricinus treten im Endosperm eine Tri-, Di- und Monoglyceride spaltende Lipase mit optimaler Aktivität im sauren pH-Bereich und eine ausschließlich Monoglyceride spaltende Lipase mit optimaler Aktivität im alkalischen pH-Bereich auf. Während diese integraler Bestandteil der Glyoxysomenmembran ist (Muto und Beevers, 1974), scheint jene mit der Sphärosomenmembran assoziiert zu sein (Ory et al., 1968). Jedoch geht nur die Entwicklung der alkalischen Lipase mit dem in vivo beobachteten Fettabbau konform, während die Triglyceridlipase ihr Aktivitätsmaximum bereits längst überschritten hat, wenn die eigentliche Mobilisierung der Reservefette beginnt und zur Zeit der höchsten Rate des Fettabbaus bereits nahezu vollständig aus dem Gewebe verschwunden ist.

Ein "Zwei-Lipasesystem" liegt auch in den Kotyledonen von Arachis hypogaea vor; jedoch konnte eine Lokalisierung der Triglyceridlipase, die ausschließlich im alkalischen pH-Bereich wirksam ist, in den Sphärosomen ausgeschlossen werden. Vielmehr wurde eine Assoziierung ihrer Aktivitäten mit der Mitochondrienfraktion sowie einer Membranfraktion beschrieben (Huang und Moreau, 1978; Sanders und Pattee, 1976).

Demgegenüber war für die Kotyledonen von Brassica napus bislang nur eine alkalische Triglyceridlipase berichtet worden. Diese ist mit einer lipolytischen Membranfraktion assoziiert, die weder mit der sphäro-

somalen Grenzmembran noch den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums identisch ist, jedoch Strukturen enthält, die die morphologischen Merkmale der sphärosomalen Appendices aufweisen (Theimer und Rosnitschek, 1978; Wanner und Theimer, 1978). Aufgrund dieser ultrastrukturellen Beobachtungen und des Befundes, daß die mit der lipolytischen Membranfraktion assoziierte Lipase sowohl quantitativ als auch qualitativ für den im Gewebe beobachteten Fettabbau verantwortlich sein kann (Rosnitschek und Theimer, 1980), sollen diese sphärosomalen Appendices alleiniger intrazellulärer Ort der Lipolyse in den Kotyledonen von Brassica napus sein.

Während bei höheren Pflanzen möglicherweise verschiedene zellphysiologische Modi der Lipolyse evolviert worden sind, geht aus den Untersuchungen zahlreicher ölspeichender Gewebe (Beevers, 1969; Frederick et al.,1975; Gerhardt, 1978; Tolbert, 1971) eindeutig hervor, daß die Enzymaktivitäten zur Umwandlung der freien Fettsäuren in Succinat stets in den Glyoxysomen, einer zur Gruppe der Microbodies zählenden Klasse von Zellorganellen, kompartimentiert sind. Das entstehende Succinat wird dann vermutlich unter mithilfe der Mitochondrien in Phosphoenolpyruvat umgewandelt, welches in Umkehr des Embden-Meyerhof-Weges als Substrat für die Gluconeogenese dient.

Zur typischen Enzymausstattung der Glyoxysomen gehören die Enzyme zur Aktivierung und der β-Oxydation der Fettsäuren (Cooper und Beevers, 1969; Cooper,1971) und die des Glyoxylsäurecyclus sowie Katalase und gelegentlich H_2O_2-produzierende Oxidasen und Transaminasen (Breidenbach und Beevers, 1967; Schnarrenberger et al., 1971; Theimer und Beevers, 1970).

Im Ricinusendosperm sind diese Enzyme in unterschiedlichen Strukturen der Glyoxysomen kompartimentiert: Isocitratlyase und Katalase kommen frei in der Glyoxysomenmatrix vor, während die Enzyme zur Aktivierung und der ß-Oxydation der Fettsäuren sowie Malatsynthetase und Citratsynthetase mit der Glyoxysomenmembran assoziiert sind (Biegelmayer et al., 1973, 1974; Huang und Beevers, 1973). Nach einer Modellvorstellung von Biegelmayer et al. (1973) sind die Glyoxysomenmembranen demnach Träger eines Multienzymsystems, das die Umwandlung von Fettsäuren in zwei Zwischenprodukte des Glyoxylsäurezyclus, Malat und Citrat, katalysiert.

Allerdings können diese Befunde nicht vorbehaltlos auf die Glyoxysomen anderer Herkunft übertragen werden. Im Gegensatz zur Isocitratlyase und Katalase, die bis dato ausschließlich in der Matrix gefunden wurden (Brown et al., 1974; Huang, 1975; Köller und Kindl, 1977; Longo et al., 1975), konnte für die Malatsynthetase eine Membranbindung nur in den Glyoxysomen der Kotyledonen von Citrullus vulgaris, Arachis hypogaea, Cucumis sativus und Cucurbita pepo, sowie des primären Endosperms von Pinus ponderosa nachgewiesen werden (Brown et al., 1974; Huang, 1975; Köller und Kindl, 1977), während in den Glyoxysomen des Maisscutellums die Malatsynthetase als Matrixenzym vorliegt (Longo et al., 1975). Eine Lokalisierung in der Matrix wurde auch von Trelease et al. (1974) aufgrund cytochemischer Befunde für die Malatsynthetase der Glyoxysomen der Kotyledonen von Helianthus annuus und Cucumis postuliert.
Aufgrund neuerer publizierter Befunde (Frevert und Kindl, 1977, 1980) scheint die Membran der Glyoxysomen von Cucumis sativus auch nicht Träger der zwei Markerenzyme der ß-Oxydation der Fettsäuren, nämlich ß-Ketothiolase und eines Enzyms mit bifunktionellem Charakter - Crotonase/ß-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase -, zu sein.

In den ersten Tagen des Keimlingswachstums steigen die Aktivitäten der glyoxysomalen Enzyme in den Fettspeicherorganen von Ölsamen drastisch an, was offenbar mit einer Zunahme der Zahl der Glyoxysomen korrespondiert (Kagawa und Beevers, 1975; Vigil, 1970). Nach dem Abbau des größten Teils der Fettreserven verschwinden die Enzymaktivitäten wieder aus dem Gewebe. Ein solcher Aktivitätswechsel ist bislang vor allem für die Enzyme des Glyoxylsäurezyclus und die Katalase nachgewiesen worden (Gerhardt und Beevers, 1970; Gerhardt, 1973; Kagawa et al., 1973; Kindl und Majunke, 1973; Longo und Longo, 1970 a,b; Schnarrenberger et al., 1971; Theimer und Rosnitschek, 1978; Theimer und Schuster, 1978), während für die Enzyme der β-Oxydation der Fettsäuren bis dato entsprechende Befunde nur an Geweben mit fast ausschließlicher Speicherfunktion, so am Ricinusendosperm (Hutton und Stumpf, 1969), Maisscutellum (Longo und Longo, 1975) und Aleurongewebe des Weizenkeimlings (Doig und Laidman, 1975) gewonnen wurden.

Der Anstieg glyoxysomaler Enzymaktivitäten beruht dabei offensichtlich auf einer de novo Enzymsynthese. Diesbezügliche Befunde wurden bis dato mithilfe der Dichtemarkierung von Proteinen mit schweren Isotopen, immunologischer Untersuchungsmethoden sowie Hemmung der Proteinsynthese durch Cycloheximid für die Enzyme des Glyoxylsäurezyclus, Isocitratlyase und Malatsynthetase, für Katalase und glyoxysomale Malatdehydrogenase erbracht (Gerhardt und Betsche, 1976, 1978; Gientka-Rychter und Cherry, 1968; Hock und Beevers, 1966; Ihle und Dure, 1972; Khan et al., 1979; Longo, 1968; Walk und Hock, 1977).

Da Microbodies nicht zur eigenen Proteinsynthese befähigt sind, werden deren Enzyme höchstwahrscheinlich vom Kern kodiert und im Cytoplasma an freien und/oder an ER-Membranen gebundenen Ribosomen syntheti-

siert. Über den Mechanismus des Imports der Enzyme in das Kompartiment "Microbody" liegen derzeit zwei verschiedene Modellvorstellungen vor: 1. An membrangebundenen Polysomen findet die Synthese der Enzyme statt, die über einen contranslationalen Prozeß (Blobel und Dobberstein, 1975; Gonzalez und Beevers, 1976; Lord und Bowden, 1978) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums abgegeben werden, aus dem an spezifischen Regionen über einen Sproßungsprozeß die Biogenese der Microbodies erfolgt. 2. Die Biosynthese der Matrixenzyme (Kindl et al., 1980; Robbi und Lazarow, 1978; Zimmermann und Neupert, 1980) und der Membranenzyme (Kindl et al., 1980) verläuft über Proteinpools des Cytosols; der Transfer und Import in das Organell erfolgt über einen posttranslationalen Prozeß.

Wie kürzlich publizierte Arbeiten von Choinski und Trelease (1978) und Köller et al. (1979) zeigen, treten Microbodies mit glyoxysomaler Enzymausstattung bereits im Verlauf der Samenreifung in den Embryonen von Baumwolle bzw. Gurke auf. Die Aktivitätsausprägung glyoxysomaler Enzyme erfolgt allerdings nicht synchron, sondern konsekutiv in der Reihenfolge Katalase - ß-Oxydation der Fettsäuren - Malatsynthetase. Für die Isocitratlyase liegen dagegen widersprüchliche Befunde vor. Obwohl m-RNS während der Samenreifung gebildet wird (Ihle und Dure, 1972), konnte das Enzym bislang nur in den Embryonen ruhender Samen von Cucurbis sativus nachgewiesen werden (Köller et al., 1979 b), während Miernyk et al. (1979) weder in diesem noch in weiteren ungekeimten Ölsamen Isocitratlyase-Aktivität finden konnten.

Aufgrund biochemischer und elektronenmikroskopischer Befunde am autolysierenden Ricinusendosperm (Gerhardt und Beevers, 1970; Vigil, 1970) beruht die Abnahme glyoxysomaler Enzymaktivitäten in diesem Gewebe offenbar auf einem Mechanismus, der das Glyoxysom als Ganzes

erfaßt, möglicherweise durch Absonderung und Verdauung in cytoplasmatischen Vakuolen. Ein analoger Abbaumechanismus wird von Kagawa und Beevers (1975) ebenfalls für die Glyoxysomen fettspeichernder Kotyledonen epigäisch keimender Samen postuliert, die im Gegensatz zum Ricinusendosperm, das ausschließlich Speicherfunktion besitzt, nach dem Heraustreten des Keimlings ans Tageslicht die ersten Photosyntheseorgane des heranwachsenden Pflänzchens bilden. Die bei diesem Differenzierungschritt des Mesophylls der Keimblätter auftretende Umwandlung der glyoxysomalen Microbodypopulation in eine peroxisomale wäre folglich auf eine durch Licht induzierte de novo Synthese einer zweiten, distinkten Microbodypopulation, den Blattperoxisomen, zurückzuführen, zu deren typischer Enzymausstattung die Enzyme des Glycolatstoffwechsels und die Katalase gehören (Beevers, 1979; Gerhardt, 1978).

Dagegen unterliegen nach einer Hypothese von Schopfer et al. (1976) ganze Microbodies einem dauernden Umsatz, wobei korrespondierend zu der durch Licht stimulierten Syntheserate peroxisomaler Enzyme jene der glyoxysomalen Enzyme abnimmt. Dies führt folglich über eine Population von Microbodies mit intermediärer Enzymausstattung, sog. Glyoxy-Peroxisomen zu reinen Peroxisomenpopulationen.

Als weitere Alternative wird von mehreren Autoren ein Wechsel der Enzymausstattung innerhalb einer einzigen Microbodypopulation durch selektiven Abbau und/oder Inaktivierung glyoxysomaler Enzyme und gleichzeitiger Neusynthese und/oder Aktivierung peroxisomaler Enzyme postuliert (Frederick et al., 1975; Gerhardt, 1973; Gerhardt und Betsche, 1976; Theimer et al., 1975).

Dabei müssen einschneidende Veränderungen an der Organellmembran ablaufen, da die peroxisomale Membran, im Gegensatz zur glyoxysomalen, nach bisherigen Befunden nicht Träger von Enzymen ist (Huang und Beevers, 1973). Während kürzlich ein Protein nachgewiesen werden konnte, das korrespondierend mit dem Verschwinden glyoxysomaler Enzymaktivitäten aus dem Gewebe auftritt und spezifisch das Matrixenzym Isocitratlyase hemmt bzw. abbaut (Khan et al., 1979; Schmid-Neuhaus, 1977; Theimer, 1976), sind diesbezüglich für Membranenzyme keine Regulationsmechanismen bekannt.

Da die Assoziation von Enzymen mit der glyoxysomalen Membran innerhalb der Ölsamenspezies stark variiert bzw. widersprüchliche Befunde vorliegen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Glyoxysomenmembran der Kotyledonen von Raps bzw. Sonnenblumenkeimlingen, zweier für die Untersuchungen verwendeter epigäisch keimender Ölsamen, hinsichtlich ihrer Enzymkomponenten charakterisiert werden. Besonderes Interesse galt dabei der glyoxysomalen Lipase als integrales Membranenzym. Da in dem von Theimer und Rosnitschek (1978) für ihre Untersuchungen verwendeten Lipase-Testsystem mit Sonnenblumenöl als Substrat der Nachweis einer ausschließlich Monoglyceride spaltenden, glyoxysomalen Lipase nicht möglich war, sollten mittels geeigneter Testmethoden deren Vorkommen nachgewiesen und zusammen mit der Triacylglyceridester spaltenden Lipase charakterisiert werden. Schließlich sollte die Entwicklung der glyoxysomalen Lipase im Verlauf von Samenreifung und -keimung untersucht und die Korrelation mit dem Entwicklungsmuster der metabolisch eng damit zusammenhängenden Enzymsysteme der ß-Oxydation der Fettsäuren und des Glyoxylsäurezyclus bestimmt werden.

B. Material und Methoden

1. Pflanzenmaterial

Für die Versuche wurde folgendes Saatgut verwendet: Helianthus annuus L. (Sorte "Sobrid", Saatgut der Bayerischen Saatgut und Futterverwertungsstelle München), Brassica napus (Winterraps Sorte "Lemkes Diamant, Difs 30 8004" und "Raporo", Fa. Samen-Schmitz-München), Citrullus vulgaris (Sorte "Florida Giant", Fa. Olds Seed Company, Madison, Wisc., USA) und Ricinus communis L. (Sorte "Hale" Fa. Baker Castor Oil Company, Plainview, Texas, USA).

2. Anzuchtmethoden

Die Samen wurden in einer 3 g/l Chinosollösung 5-10 Minuten oberflächensterilisiert und auf mit Leitungswasser angefeuchteten Vermiculit ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank bei 28°C und bei 80-100% relativer Luftfeuchtigkeit im Dunkeln.
Als Tag 0 der Keimlingsentwicklung wurde der Zeitpunkt der Aussaat der Samen festgelegt.

3. Herstellung von Gewebehomogenaten

Das Pflanzenmaterial wurde mehrmals in deionisiertem Wasser gewaschen und nach dem Abtrocknen zur Bestimmung

des Frischgewichts gewogen.
Zur Homogenisierung wurde das Pflanzenmaterial vorgekühlt und alle folgenden Arbeitsgänge wurden bei 0-5°C durchgeführt. Das Material wurde zunächst mit einer Rasierklinge in einer Reibschale in ca. 5 ml Extraktionsmedium pro Gramm Frischgewicht zerkleinert und anschließend mit dem Pistill zerrieben bis ein möglichst homogener Brei entstanden war. Das Extraktionsmedium setzte sich folgendermaßen zusammen (Beevers et al., 1974):

0.5 mol/l Saccharose, 0.15 mol/l Tricinpuffer (pH 7.5), 0.01 mol/l KCl, 0.001 mol/l $MgCl_2$, 0.001 mol/l EDTA, 1 mg/ml Dithioerythrit, 100 mg Polyclar/Gramm Frischgewicht.

Das Homogenat wurde anschießend durch sechs Lagen Gaze gepreßt und 15 Minuten lang bei 480 x g in der Kühlzentrifuge (Runne, Heidelberg) zentrifugiert. Die Fettschicht wurde sorgfältig entfernt, der Überstand dekantiert und das Sediment verworfen. Der Überstand wird im folgenden als Rohhomogenat (RH) bezeichnet.

4. Fraktionierung des Rohhomogenats

Eine weitere Fraktionierung dieses Rohhomogenats wurde mithilfe differentieller Zentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

4.1. Differentielle Zentrifugation

Das Rohhomogenat wurde durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 23 000 x g in der Kühlzentrifuge (Runne, Heidelberg) in Fettschicht, Überstand (Ü II) und Sediment (S II) fraktioniert. Die Fettschicht wurde sorgfältig abgehebert und gewöhnlich verworfen. Das Sediment, welches sich aus Mitochondrien, Proplastiden, Glyoxysomen und anderen Partikeln zusammensetzt, wurde

in Extraktionsmedium resuspendiert und im folgenden als Rohpartikelfraktion bezeichnet.

4.2. Zentrifugation im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten

In Zentrifugationsbechern (37 ml Inhalt) wurden kontinuierliche Saccharosedichtegradienten errichtet, indem auf 1 ml 771,9 g/l Saccharoselösung ein aus 13 ml 771,9 g/l Saccharose und 14 ml 251,7 g/l Saccharose im Gradientenmixer gemischter Gradient aufgeschichtet wurde, was einem Dichtebereich von 1.094 kg/l bis 1.286 kg/l (bei 20°C) entspricht. Auf diesen Gradienten wurden zusätzlich 1 bis 2 ml 251,7 g/l Saccharose und darauf vorsichtig 6 bis 7 ml des Rohhomogenats geschichtet, dessen Saccharosekonzentration bei etwa 216,2 g/l Saccharose lag.
Die Zentrifugation dieses Gradienten erfolgte in der Beckmann Ultrazentrifuge mit dem Ausschwingrotor SW 27 bei der mittleren Schwerkraft von 61 000 x g über einen Zeitraum von 4 Stunden.
Unmittelbar nach der Zentrifugation wurden die Gradienten durch eine von oben bis zum Becherboden eingeführte lange Kanüle mit einer LKB-Pumpe abgesaugt und in einem LKB-Fraktionssammler in 20 Tropfen fraktioniert.

5. Fraktionierung der Glyoxysomalfraktion

5.1. Osmotische Lyse der Glyoxysomalfraktion

Die wie in 4.2. durch isopyknische Saccharosedichtegradientenzentrifugation isolierte Glyoxysomalfraktion wurde mit dem zweifachen Volumen 0.05 mol/l Tricinpuffer, pH 7.5 tropfenweise verdünnt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit unter leichtem Rühren bei 0°C wurde die

Lösung 30 Minuten bei 129 000 x g in der Beckmann Ultrazentrifuge (Rotor 50 Ti) zentrifugiert und das resultierende Sediment in oben genannten Puffer resuspendiert.
Zur Bestimmung des Effekts der Ionenstärke auf den Solubilisierungsgrad membrangebundener glyoxysomaler Enzyme wurde die Glyoxysomalfraktion mit dem zweifachen Volumen 0.05 mol/l Tricinpuffer, pH 7.5 versetzt, in dem KCl in der jeweils angegebenen Konzentration gelöst war, und wie oben angegeben fraktioniert.

5.2. Zentrifugation im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten

Ein Aliquot (ca. 10 ml) der osmotisch lysierten Glyoxysomalfraktion wurde über einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (23 ml) geschichtet, dessen Dichte von 1.094 kg/l (entsprechend 251,7 g/l Saccharoselösung) bis 1.263 kg/l (entsprechend 707,4 g/l Saccharoselösung) zunahm; zusätzlich wurden über diesen Gradienten noch 3 ml 216,2 g/l Saccharoselösung geschichtet. Die Gradienten wurden 16 Stunden in der Beckmann Ultrazentrifuge mit dem Ausschwingrotor SW 27 bei einem mittleren Schwerefeld von 61 900 x g zentrifugiert.
Bei einem Teil der Experimente wurden solche Gradienten (29 ml) 30 Minuten in der Sorvall RC-5B Automatischen Hochgeschwindigkeitskühlzentrifuge im Vertikalrotor SV 288 bei einem durchschnittlichen Schwerefeld von 40 300 x g zentrifugiert.
Unmittelbar nach der Zentrifugation wurden die Gradienten wie in 4.2. angegeben fraktioniert.

6. Messung der Enzymaktivitäten

Soweit nicht anders angegeben wurden die Enzymaktivitäten mit photometrischen Testmethoden in einem Gilford Spektralphotometer, Modell 2400 S, bei Raumtemperatur (ca. 20°C) gemessen.

6.1. Fumarase

(L-Malate-Hydro-Lyase, E.C.4.2.1.2)
(Nach Racker, 1950)

Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml:

Tricinpuffer, pH 7.5	0.1	mol/l
Triton X-100	0.1	g/l
Malat	0.25	mmol/l
Enzymlösung		

Die Bildung von Fumarat wurde bei 240 nm verfolgt.
Der Extinktionskoeffizient ist 2.44×10^3 cm^2/mol.

6.2. β-Oxydation der Fettsäuren

(Nach Cooper und Beevers, 1969)

Im Testansatz (1 ml) waren enthalten:

Phosphatpuffer, pH7.5	0.1	mol/l
Dithioerythrit	3.1	mmol/l
Coenzym A	0.13	mmol/l
Na-glyoxylat	2.5	mmol/l
Acetylpyridin-NAD	0.14	mmol/l
Palmitoyl-CoA	6.3	µmol/l
(≙ 10 µl einer Lösung von Palmitoyl-CoA in Äthylenglycolmonomethyläther)		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Palmitoyl-CoA gestartet und die Extinktionszunahme bei 363 nm verfolgt.
Der Extinktionskoeffizient beträgt: $8,2 \times 10^6$ cm^2/mol.

6.3. β-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase

(Acyl-CoA: (Acceptor) oxidoreductase, E.C.1.3.99.3)
(Nach Overath et al., 1967)

Im Testansatz (1 ml) waren enthalten:

Phosphatpuffer, pH 6.8	0.05	mol/l
EDTA	2.0	mmol/l
Rinderserum-Albumin	1	g/l
$NADH_2$	0.211	mmol/l
Acetoacetyl-CoA	0.12	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Acetoacetyl-CoA gestartet und die Extinktionsabnahme bei 340 nm verfolgt. Extinktionskoeffizient: 6.22×10^6 cm^2/mol.

6.4. β-Ketothiolase

(Acetyl-CoA-C-Acetyltransferase, E.C.2.3.1.9.)
(Nach Cooper und Beevers, 1969)

Im Testansatz (1 ml) waren enthalten:

Triäthanolaminpuffer, pH 7.2	0.075	mol/l
$MnCl_2$	0.19	mmol/l
Dithioerythrit	2.3	mmol/l
Acetylpyridin-NAD	0.14	mmol/l
Coenzym A	0.25	mmol/l
Citratsynthetase	20	µg
Acetoacetyl-CoA	0.045	mmol/l
Malat	3.1	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Acetoacetyl-CoA gestartet und die Reduktion von Acetylpyridin-NAD bei 363 nm im Spektralphotometer verfolgt.
Extinktionskoeffizient: 8.2×10^6 cm^2/mol.

6.5. Glutamat-Oxalacetat-Amino-Transferase

(Aspartate Aminotransferase, E.C.2.6.1.1)
(Nach Yamazaki und Tolbert, 1970)

Im Testansatz (1ml) waren enthalten:

Phosphatpuffer, pH 7.4	0.1	mol/l
L-Asparaginsäure	40.0	mmol/l
$NADH_2$	0.24	mmol/l
α-Ketoglutarat	17.4	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde am Verbrauch von $NADH_2$ bei 340 nm verfolgt. Extinktionskoeffizient: 6.22×10^6 cm^2/mol.

6.6. Glykolatoxidase

(Glycolate: Oxygen Oxidoreductase, E.C.1.1.3.1)
(Nach Baker und Tolbert, 1966)

Im Testansatz (1 ml) waren enthalten:

Phosphatpuffer, pH 8.0	45.0	mmol/l
EDTA	3.0	mmol/l
Phenylhydraziniumchlorid	10.0	mmol/l
Natriumglykolat	5.0	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Natriumglykolat gestartet und die Extinktionszunahme bei 324 nm verfolgt. Extinktionskoeffizient: 1.7×10^7 cm^2/mol.

6.7. Hydroxypyruvatreduktase

(Glycolat: NAD-Oxidoreductase, E.C.1.1.1.26)
(Nach Tolbert et al., 1970)

Der Phosphatpuffer enthielt in einem Endvolumen von 1 ml:

Phosphatpuffer, pH 5.8	25.0 mmol/l
$NADH_2$	0.2 mmol/l
Dithioerythrit	1.0 mmol/l
Triton X-100	0.1 g/l
Hydroxypyruvat	1.0 mmol/l
Enzymlösung	

Die Reaktion wurde am Verbrauch von $NADH_2$ bei 340 nm verfolgt. Extinktionskoeffizient: 6.22×10^6 cm^2/mol.

6.8. Isocitratlyase

(Threo-D_s-Isocitrate-Glyoxylate-Lyase, E.C.4.1.3.1)
(Nach Dixon und Kornberg, 1959)

Im Testansatz (1 ml) war enthalten:

Phosphatpuffer, pH 6.9	85.0 mmol/l
Dithioerythrit	4.0 mmol/l
$MgCl_2$	4.5 mmol/l
Phenylhydraziniumchlorid	10.0 mmol/l
threo-D_s-Isocitrat	4.0 mmol/l
Triton X-100	0.1 g/l
Enzymlösung	

Die Reaktion wurde bei einer Meßstrahlung von 324 nm verfolgt. Extinktionskoeffizient: 1.7×10^7 cm^2/mol.

6.9. Katalase

(H_2O_2: H_2O_2-Oxidoreductase, E.C.1.11.1.6)
(Nach Lück, 1965)

Zu 1 ml frisch zubereiteter 0.01 mol/l H_2O_2-Lösung in 0.06 mol/l Phosphatpuffer (pH 7.0) wurde die Enzymlösung gegeben. Die Anfangsrate der Zersetzung des H_2O_2 (20 sec) wurde bei 240 nm im Spektralphotometer verfolgt. Den Aktivitätsberechnungen lag der Extinktionskoeffizient für H_2O_2 von 3.9×10^4 cm^2/mol zugrunde.

6.10 Lipase

(Glycerolesterhydrolase, E.C.3.1.1.3)

6.10.1. Fluorimetrische Testmethode

(Nach Guilbault und Hiesermann, 1969; Muto und Beevers, 1974)

Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 37°C mit einem Eppendorf - Fluorophotometer (Primärfilter Hg 405 - 430 nm; Sekundärfilter mit Durchlaßbereich von 470 - 3000 nm).

Das Testgemisch (2 ml Endvolumen) enthielt im Standardansatz:

Tris/HCl-Puffer, pH 8.5 bzw 9.0	0.095	mol/l
Dithioerythrit	4.0	mmol/l
N-Methylindoxylmyristat	0,5	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats (50 µl einer Lösung von N-Methylindoxylmyristat in Äthylenglycolmonomethyläther) gestartet und die Zunahme der Fluoreszenz etwa drei Minuten lang verfolgt.
Da N-Methylindoxyl in Lösung instabil ist und somit keine Eichkurve mit N-Methylindoxylstandardlösungen aufgestellt werden konnte, wurde als Maß für die Lipaseaktivität die Zunahme der Fluoreszenz pro Minute genommen ($\Delta F/min$).

6.10.2. Colorimetrische Testmethoden

6.10.2.1. Colorimetrische Testmethode mit p-Nitrophenyl-Fettsäureester als Substrat

(Nach Desnuelle und Savary, 1963; Sadar und Ayranci, 1978)

Das Testgemisch (1 ml Endvolumen) enthielt im Standardansatz:

Tris/HCl-Puffer, pH 8.5 bzw. 9.0	0.09	mol/l
p-Nitrophenyl-Fettsäureester	1.0	mmol/l
Enzymlösung		

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrats (50 µl einer frischen Lösung von p-Nitrophenyl-Fettsäureester in Äthylenglycolmonomethyläther) gestartet und die Anfangsrate der Bildung von p-Nitrophenol bei 405 nm im Spektralphotometer verfolgt. Der Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol beträgt 18.8×10^6 cm^2/mol.

6.10.2.2. Colorimetrische Methode mit Tri- und Monoglyceriden als Substrat

(Nach Duncombe, 1959; Muto und Beevers, 1974)

In dieser Methode werden die durch die Lipase freigesetzten Fettsäuren in Form ihrer Kupfersalze mit Natriumdiäthyldithiocarbaminat als Kupfernachweisreagenz bestimmt.
Als Substrate wurden Sonnenblumenöl (Fa. Schneekoppe, kaltgeschlagen erste Pressung), Triolein (Fa. Serva) und Monopalmitin (Glycerin-1-monopalmitat; Fa. Sigma) verwendet.
Zur Herstellung der jeweiligen Substratemulsion wurde eine Mischung von 0.5 g Sonnenblumenöl bzw. 177 mg Triolein bzw. 66 mg Monopalmitin (in einem geringen Volumen Chloroform gelöst), 0.5 g Gummi arabicum (Merck, DAB 7, fein gepulvert) und 9 ml 0.1 mol/l Tris/HCl-puffer, pH 8.5 bzw. 9.0 mit einem Mixer (Ultra - Turrax, Typ TP 18-10) 3 Minuten lang emulgiert.
Um das Chloroform aus der Emulsion zu entfernen, wurde diese bei 50°C eine Stunde lang mit Stickstoff gespült. Die Endkonzentration der Emulsionen von Triolein und Monopalmitin betrug 20 mmol/l, von Sonnenblumenöl etwa 50 mmol/l.

Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen:

Tris/HCl -Puffer, pH 8.5 bzw 9.0	0.09 mol/l
Dithioerythrit	4.0 mmol/l
Substratemulsion	5.0 mmol/l
Enzymlösung	

Das Reaktionsgemisch wurde je nach Enzymaktivität 30 - 120 Minuten lang bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 1 ml Kupferreagenz (0.27 mol/l $Cu(NO_3)_2 \times 3\ H_2O$ und 0.5 mol/l Triäthanolaminhydrochloridpuffer, pH 7.5) und 5 ml Chloroform gestoppt. Zu jeder Probe wurde ein Blindwert (Zugabe des Enzyms nach der jeweiligen Inkubationszeit) angesetzt. Die Reagenzgläser wurden auf einer Schüttelmaschine 20 Minuten kräftig geschüttelt. Die wässrige Phase wurde sorgfältig entfernt und 2 ml der Chloroformphase mit 0.2 ml einer 11 mmol/l Natriumdiäthyldithiocarbaminatlösung versetzt. Die Extinktion wurde bei 436 nm gegen die jeweilige Blindprobe als Nullwert im Eppendorf Photometer gemessen. Zur Ermittlung der Konzentration der Fettsäuren, die den gemessener Extinktionswerten zugrunde lag, wurde eine Eichkurve mit einer Ölsäurestandardlösung aufgestellt.

6.11. Malatsynthetase

(Nach Dixon und Kornberg, 1959)

Der Testansatz von 1 ml Endvolumen enthielt:

Tris/HCl -Puffer, pH 8.0	0.1 mol/l
$MgCl_2$	5.0 mmol/l
Acetyl-CoA	0.1 mmol/l
Natriumglyoxylat	3.3 mmol/l
Enzymlösung	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glyoxylat gestartet und bei 232 nm im Spektralphotometer verfolgt. Eine Extinktionsabnahme von $\Delta E = 0.1$ entspricht 9,35 nmole freigesetztem CoA.

6.12 Malatdehydrogenase

(L-Malate: NAD-Oxidoreductase, E.C.1.1.37)
(Nach Ochoa, 1955)

Das Testgemisch enthielt in 1 ml Endvolumen:

Phosphatpuffer, pH 7.5	0.1 mol/l
$NADH_2$	0.24 mmol/l
Oxalacetat	0.1 mmol/l
Enzymlösung	

Die Extinktionsabnahme wurde bei einer Meßstrahlung von 340 nm verfolgt. Extinktionskoeffizient: 6.22×10^6 cm^2/mol.

6.13. $NADH_2$-Cytochrom-c-Reduktase

($NADH_2$: Ferricytochrome c (b_5)-Oxidoreductase, E.C.1.6.2.a)
(Nach Lord et al., 1973)

Das Testgemisch enthielt in 1 ml Endvolumen:

Phosphatpuffer, pH 7.2	0.032 mol/l
Cytochrom c, oxidiert	0.5 g/l
$NADH_2$	0.211 mmol/l
NaCN	5.0 mmol/l
Enzymlösung	

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Cytochrom c gestartet und dessen Reduktion bei 550 nm im Spektralphotometer verfolgt.
Der Extinktionskoeffizient: 28.4×10^3 cm^2/mol.

7. Bestimmung des Proteingehaltes

Der apparente Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt. Als Standard dienten Rinderserumalbuminlösungen.

8. Bestimmung der Saccharosekonzentration

Die Saccharosekonzentration wurde durch Messung des refraktiven Index in einem auf Saccharose geeichten Refraktometer (Fa. Atago) bestimmt und die jeweilige Dichte einer Eichkurve (Tabellen der Fa. ISCO) entnommen.

C. Ergebnisse

I. Entwicklung und Lokalisation der Lipaseaktivität in Kotyledonen von Raps und Sonnenblumen

1. Vorversuche zur Testmethode

Um die Aktivitäten von Lipasen in den Kotyledonen von Raps- und Sonnenblumenkeimlingen nachweisen zu können, wurden in den folgenden Untersuchungen eine colorimetrische Testmethode (Desnuelle und Savary, 1963) und eine fluorimetrische Testmethode (Guilbault und Hiesermann, 1969) mit künstlichen Substraten für die Lipase verwendet. Diese besitzen ähnlich lipophile Eigenschaften wie natürliche Monoglyceride langkettiger Fettsäuren und können demzufolge von echten Triglyceride spaltenden Lipasen (Hasson und Laties, 1976; Hayase und Tappel, 1970; Muto und Beevers, 1974; Rosnitschek und Theimer, 1980; Theimer und Rosnitschek, 1978), Monoglyceridlipasen (Huang und Moreau, 1978; Muto und Beevers, 1974) sowie von Phopho- bzw. Galactolipasen (Hasson und Laties, 1976) hydrolysiert werden.

In Vorversuchen mit gereinigter Triglyceridlipase aus Aspergillus rhizopus (Fa. Serva) und gereinigter Esterase aus Schweineleber (Fa. Böhringer, frei von Lipase) sollte zunächst die Spezifität der beiden Testmethoden abgegrenzt werden. Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, spalten sowohl die gereinigte Triglyceridlipase als auch die gereinigte Esterase die beiden künstlichen Substrate N-Methylindoxylmyristat (MIM) im fluorimetrischen Test und p-Nitrophenylester langkettiger Fettsäuren im colorimetrischen Test.

Tab.1: Spezifische Enzymaktivitäten von gereinigter, käuflicher Lipase (aus Aspergillus rhizopus) und käuflicher Esterase (Carboxylesterase aus Schweineleber) bei pH 9.0 mit künstlichen Substraten im fluorimetrischen bzw. colorimetrischen Test.

Substrat	Enzym	
	Lipase	Esterase
N-Methylindoxylmyristat	ΔF/min x mg Protein	
	1.12	0.138
p-Nitrophenylester von:	pkat/mg Protein	
Acetat (C_2)	137	13200
Propionat (C_3)	97,5	11000
Valeriat (C_5)	266	9500
Caprylat (C_8)	709	4800
Decanat (C_{10})	443	890
Laurat (C_{12})	620	270
Myristat (C_{14})	443	53
Palmitat (C_{16})	319	54
Stearat (C_{18})	638	11

Allerdings liegt die spezifische Aktivität der Esterase im Vergleich zur Lipase deutlich niedriger. Beim Nachweis lipolytischer Enzymaktivitäten in den Zellhomogenaten und -fraktionen muß demnach die begrenzte Selektivität beider Testmethoden entsprechend berücksichtigt werden.
Lipasen können jedoch von unspezifischen Esterasen durch die unterschiedliche Substratspezifität gegenüber p-Nitrophenylestern verschieden langer Fettsäuren unterschieden werden. Wie Tabelle 1 zeigt, ergibt sich für die Esterase eine positive Korrelation zwischen Zunahme der Hydrophilie des Esters und dessen Hydrolyserate. So werden die stark lipophilen Ester der Myristin-, Palmitin- und Stearinsäure nur etwa mit 1/100 der Rate umgesetzt, mit der die wasserlöslichen p-Nitrophenylester der Essig-, Palmitin- und Valeriansäure gespalten werden. Die Lipase dagegen hydrolysiert die erstgenannten Substanzen etwa 4-6 mal schneller.

2. Entwicklung der Lipaseaktivität im Verlauf von Reifung und Keimung

Mit Rohhomogenaten (RH) von Sonnenblumenkotyledonen konnte mit der titrimetrischen Testmethode (Näher, 1970) keine Freisetzung von Fettsäuren aus Sonnenblumenöl gemessen werden, was mit Befunden von Rosnitschek (1977) übereinstimmt. Dagegen ergab sowohl der colorimetrische Test mit p-Nitrophenyldecanat als Substrat als auch die fluorimetrische Testmethode mit MIM als Substrat in Sonnenblumenextrakten gut meßbare Lipaseaktivitäten (Tab.2).
In den Homogenaten von Rapskotyledonen fand sich jedoch eine bis zu 20-fach höhere apparente Lipaseaktivität. Im Vergleich dazu differiert die Höhe der Aktivitäten glyoxysomaler Enzyme in den Kotyledonen dieser beiden Pflanzenarten nur geringfügig.

Tab. 2: Aktivität der Lipase und glyoxysomaler Enzyme in den Rohhomogenaten der Kotyledonen von Raps- und Sonnenblumenkeimlingen. Die Messung der Lipaseaktivität erfolgte mit der fluorimetrischen Testmethode mit MIM als Substrat.

Enzym	Pflanzenmaterial					
	Raps			Sonnenblumen		
	2 kt	3 kt	4 kt	2 kt	3 kt	4 kt
Lipase						
ΔF/min x FG	61	289	228	9	14,3	5,2
CAT						
µkat/g FG	130	177	130	152	275	294
ICl						
nkat/g FG	17	37	-	14	22,4	24,6
MS						
nkat/g FG	30	41	28,8	42	53,7	65,7

Die geringe Lipaseaktivitätin Sonnenblumenkotyledonen läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß nur eine alkalische Monoglyceridlipase mit den angewandten Testmethoden erfaßt wurde, da die Triglyceride spaltende Lipase durch einen im Homogenat vorkommenden Inhibitor (Rosnitschek, 1977) gehemmt ist. In Homogenaten von Rapskotyledonen werden die künstlichen Substrate dagegen von beiden Lipasen gespalten.

Auch die Entwicklung der Lipaseaktivität im Verlaufe der Keimung unterscheidet sich beim Raps von der bei Sonnenblumen. In ruhenden Rapssamen war auch mit künstlichen Substraten keine Lipaseaktivität meßbar, was die Befunde von Theimer und Rosnitschek (1978) bestätigt. Dagegen zeigten Homogenate ruhender Sonnenblumensamen bereits deutlich meßbare Lipaseaktivität (ca. 0.1 ΔF/min x KP).

Auch Homogenate von Embryonen reifender Helianthussamen besitzen zumindest eine Monoglyceridlipase-Aktivität, da im fluorimetrischen Test N-Methylindoxylmyristat gespalten wird.

Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, steigt die Lipaseaktivität in Sonnenblumenkotyledonen nach einer lag-Phase von einem Tag nach Keimungsbeginn bis zum Tag 3 auf das 15-fache an, um dann in den folgenden 4 Tagen wieder allmählich aus den Zellen zu verschwinden. Damit folgt der Verlauf der Entwicklung der Lipaseaktivität praktisch dem der glyoxysomalen Enzymaktivitäten (s. Kap.III).

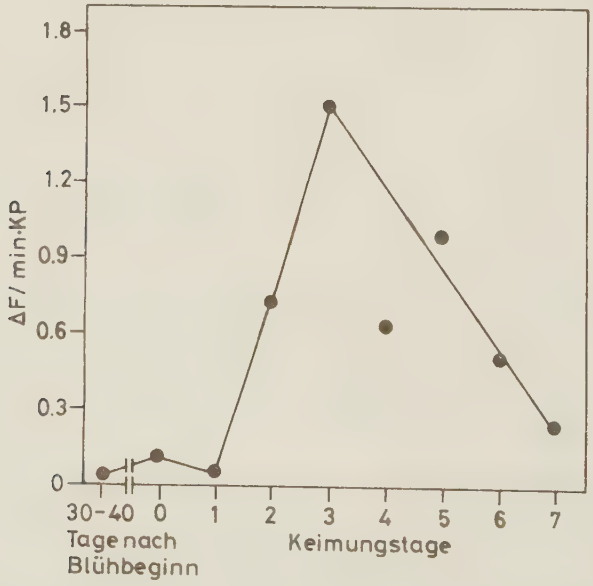

Abb.1: Verlauf der Entwicklung alkalischer Lipaseakivität in den Embryonen und Kotyledonen von Sonnenblumensamen während Reifung und Dunkelkeimung. Die Messung der Lipaseaktivität erfolgte in den Rohhomogenaten mit der fluorimetrischen Testmethode bei pH 9.0.

3. Intrazelluläre Lokalisation

3.1. Differentielle Zentrifugation der Rohhomogenate

Die differentielle Fraktionierung von Rohhomogenaten der Kotyledonen 2, 3 und 7 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge sowie 3 Tage alter, etiolierter Rapskeimlinge ergab die in Tabelle 3 zusammengestellte Verteilung der Aktivitäten von Lipase und MS (als Leitenzym der Glyoxysomen) in Rohpartikelfraktion und Überstand.

Tab.3: Verteilung der Aktivitäten der Lipase und MS zwischen partikulärer und löslicher Fraktion nach Zentrifugation von Rohhomogenaten aus Kotyledonen etiolierter Raps- und Sonnenblumenkeimlinge bei 23 000 x g (100% = Summe der Aktivitäten in Rohpartikelfraktion und Überstand).

Pflanzenspezies		Enzym					
		MS		Lipase			
				fluorimetr.Test		colorimetr.Test[1]	
		nkat/g FG	%	ΔF/min x g FG	%	nkat/g FG	%
Sonnenblume							
	U_1	42,7		6,4		-	
2 kt	U_2	20,9	80	2,9	50	-	
	S_2	5,1	20	2,9	50	-	
	U_1	53,7		14,3		-	
3 kt	U_2	29,8	70	6,5	46	-	
	S_2	12,7	30	7,6	54	-	
	U_1	34		1,8		-	
7 kt	U_2	15	69	1,2	75	-	
	S_2	6,8	31	0,43	25	-	
Raps							
	U_1	41,3		289		259	
3 kt	U_2	16,8	56	283	96	230	88
	S_2	13,4	44	12,5	4	31,4	12

[1] Als Substrat diente p-Nitrophenylcaprylat

Daraus geht hervor, daß in Kotyledonen junger Keimlinge im Vergleich zur Aktivität der MS ein höherer Prozentsatz der Lipaseaktivität an Partikel gebunden zu sein scheint. So findet man 2 bzw. 3 Tage nach Keimungsbeginn ca. 50% der Lipaseaktivität in der Rohpartikelfraktion, die aber nur maximal 30% der Gesamtaktivität der MS aufweist. Im weiteren Verlauf der Keimung, z.B. bei Kotyledonen 7 Tage alter, etiolierter Keimlinge, bleibt der Anteil an strukturgebundener MS-Aktivität unverändert, jener der Lipase sinkt dagegen deutlich auf ca. 25% ab. Zusätzlich zur Abnahme der Gesamtaktivität der Lipase scheint sie somit auch ihre Bindung an partikuläre Strukturen zu verlieren.

Anders sind die Verhältnisse offenbar in den Kotyledonen von Raps. Wie Tab. 3 zeigt, verbleibt der Hauptanteil der Lipaseaktivität 3 Tage alter, etiolierter Rapskotyledonen in der löslichen Fraktion, was mit früheren Befunden von Rosnitschek (1977) gut übereinstimmt. Je nach Testmethode finden sich nur zwischen 4% und 12% der Lipaseaktivität in der Rohpartikelfraktion, die jedoch 45% der MS-Aktivität und 20% des Proteins enthält. Allerdings ist die nach Fraktionierung sedimentierbare Lipaseaktivität noch doppelt so hoch wie jene in der Partikelfraktion von Sonnenblumenkotyledonen. Dies weist darauf hin, daß in beiden Pflanzenspezies die Monoglyceridlipase-Aktivität ähnlich hoch sein könnte, da auch die MS-Aktivität in ihren absoluten Werten vergleichbar ist.

3.2. Fraktionierung im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten

Um zu überprüfen, ob ein Teil der partikulären Lipaseaktivität tatsächlich in den Glyoxysomen lokalisiert ist, wurden Rohhomogenate der Kotyledonen verschieden alter,

etiolierter Raps- und Sonnenblumenkeimlinge im kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (251,7 - 771,9 g/l Saccharose) fraktioniert.

Abb. 2 zeigt das für die Kotyledonen 2, 3 und 5 Tage alter Sonnenblumenkeimlinge erhaltene Verteilungsmuster der Aktivitäten der Lipase, CAT (als Leitenzym der Glyoxysomen) und Fum (als Leitenzym der Mitochondrien). Daraus geht hervor, daß etwa 40% der Lipaseaktivität zwei und drei Tage alter Kotyledonen in der Glyoxysomalfraktion lokalisiert ist, die mit einer Schwebedichte von 1.26 kg/l sedimentiert, wie die Verteilung der glyoxysomalen Leitenzymaktivität CAT zeigt.

Ein nicht so ausgeprägter Aktivitätsgipfel tritt in einem für Membranstrukturen (Huang und Moreau, 1978; Lord et al., 1973; Muto und Beevers, 1974; Theimer und Rosnitschek, 1978) typischen Dichtebereich von 1.11 - 1.15 kg/l auf, in dem sich etwa 20% der auf die Gradienten aufgetragenen Lipaseaktivität wiederfindet.

Diese lipolytische Membranfraktion unterscheidet sich deutlich in ihrer Schwebedichte von den Membranvesikeln lysierter Glyoxysomen (s.Kap.IV, Abb.20) sowie von den Mitochondrien. Sie weist allerdings eine erhebliche Kontamination mit CAT-Aktivität auf, was möglicherweise auf artifizielle Anhaftung gelöster CAT an die Membranen zurückzuführen ist (Biegelmayer et al., 1974). Entsprechend kann auch eine Verunreinigung dieser Fraktion mit glyoxysomaler Lipase nicht ausgeschlossen werden.

Aus Abb. 2 geht hervor, daß sich die Verteilung der Lipaseaktivität in Abhängigkeit vom Alter der Keimlinge deutlich ändert. Während die Aktivität in der Membranfraktion stets in etwa gleich bleibt, sedimentieren in der Glyoxysomalfraktion fünf Tage alter Kotyledonen nur mehr 13% der lipolytischen EA.

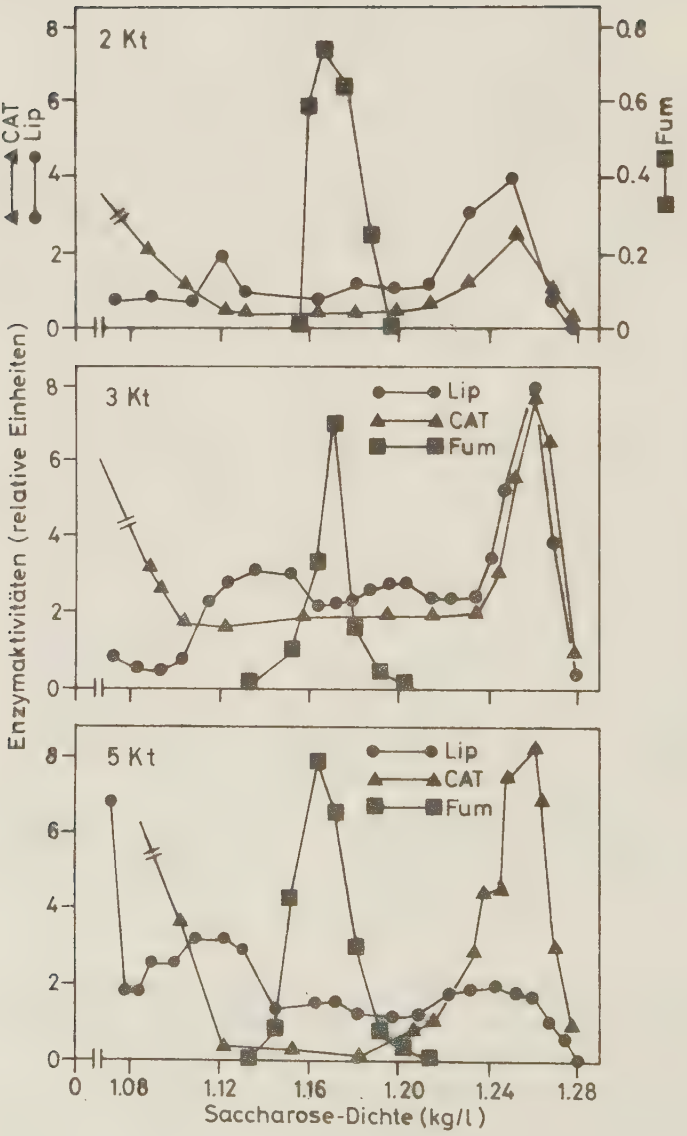
2 Kt
3 Kt
5 Kt
CAT
Lip
Fum
Enzymaktivitäten (relative Einheiten)
Saccharose-Dichte (kg/l)
0
1.08
1.12
1.16
1.20
1.24
1.28

Abb. 2

Korrespondierend mit der Abnahme der Lipaseaktivität in der Glyoxysomalfraktion, die deutlich höher ist als jene der Gesamtaktivität (s.Abb.1), tritt eine Zunahme löslicher lipolytischer EA auf. Deren relativer Anteil an der Gesamtaktivität der Lipase 5 Tage alter, etiolierter Kotyledonen beträgt nahezu 30%, während nach zwei bzw. drei Tagen Keimung weniger als 10% der Lipaseaktivität im Überstand des Gradienten verblieben.

Stets findet sich in der Mitochondrienfraktion mit einer Schwebedichte von 1.17 kg/l, ersichtlich aus dem Verteilungsprofil der FUM-Aktivität, ein Teil der Lipaseaktivität, der höher ist als der Anteil der übrigen glyoxysomalen Enzymaktivität. Möglicherweise ist die Mitochondrienbande sowohl mit lipolytischem Membranmaterial als auch mit glyoxysomalen Membranvesikeln bzw. beschädigten Glyoxysomen verunreinigt.

Andererseits kann anhand der vorliegenden Daten das Vorkommen einer alkalischen Lipase in den Mitochodrien, wie sie für Erdnußkotyledonen (Huang und Moreau, 1978; Jacks et al., 1967) und Hefezellen (Schousboe, 1976) diskutiert wurde, nicht ausgeschlossen werden. Dies wurde aber im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Abb. 2: Verteilung der Lipaseaktivität im Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung der Rohhomogenate von Kotyledonen 2, 3 und 5 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge.

1 Einheit entspricht:

Lip	0.0183	ΔF/min x KP
CAT	384	nkat/KP
FUM	50	nkat/KP

Die Auftrennung eines Rohhomogenats zwei Tage alter, etiolierter Rapskeimlinge im Saccharosedichtegradienten ergab das in Abb.3 dargestellte Verteilungsmuster von Protein und Aktivitäten der Lipase und mitochondrialen bzw. glyoxysomalen Leitenzymen.

Die Glyoxysomalfraktion sedimentierte im Gradienten mit einer Schwebedichte von 1.23 kg/l. Dies ist ersichtlich aus den Aktivitätsmaxima der glyoxysomalen Enzyme CAT, ICl und MS sowie HAD, eines Leitenzyms der ß-Oxydation der Fettsäuren. Letzeres Enzym besitzt einen weiteren Aktivitätsgipfel in der Mitochondrialfraktion, die durch die Verteilung der Fum-Aktivität angezeigt wird. Dies kann jedoch nicht als Ausdruck einer zusätzlichen Lokalisierung der ß-Oxydation der Fettsäuren in den Mitochondrien gewertet werden, da ein weiterer Aktivitätspeak der ausschließlich glyoxysomalen MS mit jenem der HAD bei der Schwebedichte von 1.176 kg/l zusammenfällt. Daher muß vielmehr mit einer Verunreinigung der Mitochondrialfraktion mit beschädigten Glyoxysomen gerechnet werden.

Abb.3: Verteilung der Enzymaktivitäten der Lipase, ß-Hydroxy-acyl -CoA dehydrogenase, Isocitratlyase, Malatsynthetase, Katalase und Fumarase sowie des Proteins im linearen Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung eines Rohhomogenats von Kotyledonen 2 Tage alter, etiolierter Rapskeimlinge.

1 Einheit entspricht:

Prot	5	µg/KP
Lip	0.02	ΔF/ min x KP
HAD	10	pkat/KP
ICl	3	pkat/KP
MS	6	pkat/KP
CAT	25	nkat/KP
Fum	20	nkat/KP
Saccharose	216	g/l

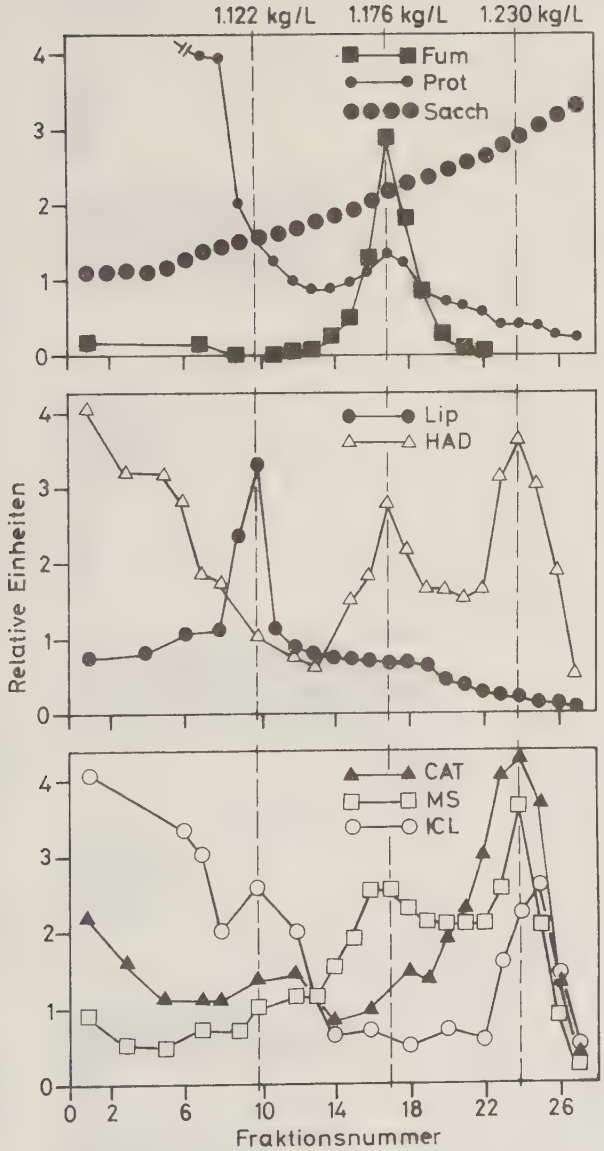
1.122 kg/L
1.176 kg/L
1.230 kg/L
Fum
Prot
Sacch
Lip
HAD
CAT
MS
ICL
Relative Einheiten
Fraktionsnummer
0
1
2
3
4
0
2
6
10
14
18
22
26

Abb. 3

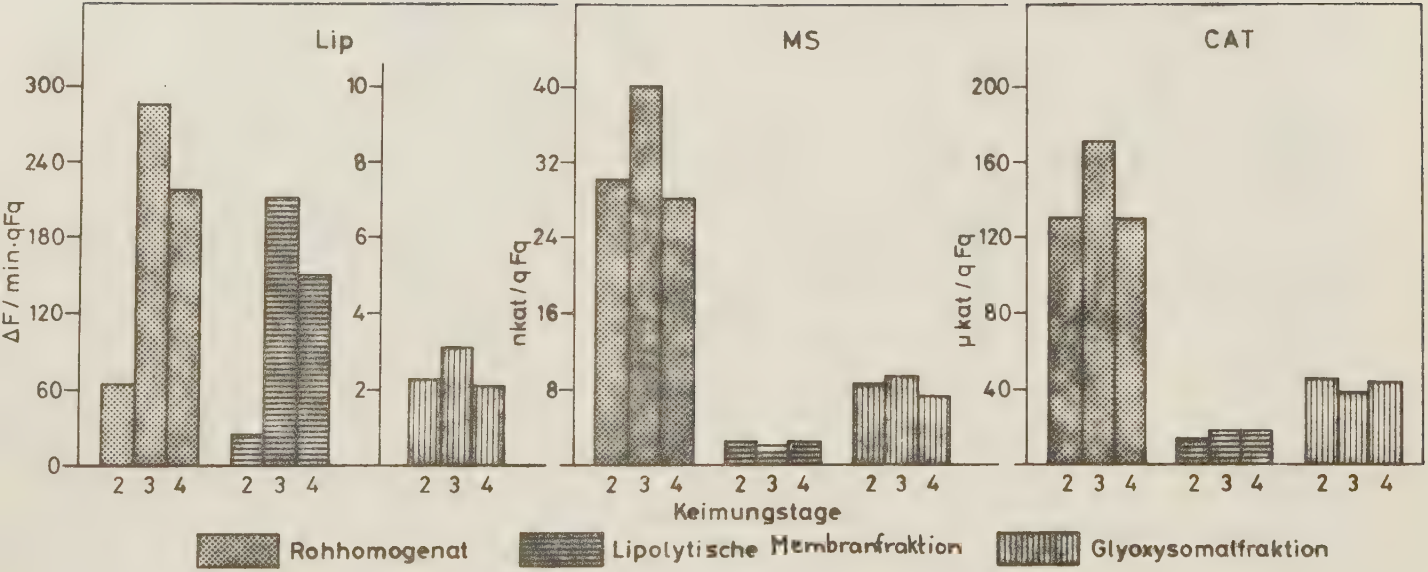
Lip
MS
CAT
ΔF / min·qFq
nkat / q Fq
µkat / q Fq
300
240
180
120
60
0
10
8
6
4
2
40
32
24
16
8
200
160
120
80
40
2 3 4
Keimungstage
Rohhomogenat
Lipolytische Membranfraktion
Glyoxysomatfraktion

Abb. 4

In der Glyoxysomalfraktion ist eindeutig Lipase nachweisbar, die aber nur ca. 4% der auf den Gradienten aufgetragenen Aktivität repräsentiert. Überraschenderweise tritt jedoch in diesem Dichtebereich kein Aktivitätsgipfel auf. Neben einer Aktivitätsschulter in der Mitochondrialfraktion findet sich ca. 40% der Lipaseaktivität in einer lipolytischen Membranfraktion der Schwebedichte von 1.122 kg/l, was mit Daten von Theimer und Rosnitschek (1978) übereinstimmt, die mit dem titrimetrischen Test erbracht wurden.

Wie aus Abb.4 deutlich hervorgeht, zeigt die Entwicklung von Lipaseaktivität während der ersten Keimungstage von Rapssamen in den Glyoxysomalfraktionen einen anderen Verlauf als in den Rohhomogenaten bzw. in den lipolytischen Membranfraktionen. In letzteren erfolgt vom zweiten auf den dritten Keimungstag eine 5 bzw. 9 fache Aktivitätszunahme pro Gramm Frischgewicht, während die glyoxysomale Lipaseaktivität sich ebenso wie die Aktivität glyoxysomaler Leitenzyme nur mehr geringfügig ändert.

Damit einhergehend sinkt der relative Anteil der Lipaseaktivität in der Glyoxysomalfraktion drei und vier Tage alter Kotyledonen auf nur mehr 1% der lipolytischen Gesamtaktivität, während er gleichzeitig in den lipolytischen Membranfraktionen auf ca. 70% zunimmt.

Dennoch sind die Größen der spezifischen Lipaseaktivitäten in den Glyoxysomalfraktionen von Raps- und Sonnenblumenkotyledonen durchaus vergleichbar und unterscheiden sich maximal um einen Faktor von 3 (Tab.4).

Abb.4: Verlauf der Entwicklung der Aktivitäten der Lipase und glyoxysomaler Enzyme in den Rohhomogenaten, lipolytischen Membranfraktionen und Glyoxysomalfraktionen von Kotyledonen 2, 3 und 4 Tage alter, etiolierter Rapskeimlinge.

Diese Korrelation findet sich auch bei den übrigen glyoxysomalen Enzymen CAT, MS, ICL und HAD.

Tab.4: Vergleich spezifischer Enzymaktivitäten in der Glyoxysomalfraktion von Kotyledonen etiolierter Raps- bzw. Sonnenblumenkeimlinge.

		CAT µkat/mgP	MS nkat/mgP	ICL nkat/mgP	HAD nkat/mgP	LIP ΔF/min x mgP
Raps	2 kt	36,5	6,43	2,13	9,3	1,71
	3 kt	37,5	3,9	2,28	-	1,65
	4 kt	31,3	4,22	-	-	1,44
SB	2 kt	28	5,4	4,14	11,7	2,7
	3 kt	112	10,1	7,89	22	5,15
	5 kt	105	19,7	6,4	3,9	1,54

Somit besteht auch für die Glyoxysomen von Raps- und Sonnenblumenkotyledonen, wie bei denen anderer Fettspeichergewebe (Huang, 1975), eine beachtliche Übereinstimmung in den spezifischen Aktivitäten glyoxysomaler Enzyme. Im Gegensatz zu Befunden von Huang (1975) gilt dies auch für die mit der Glyoxysomalfraktion assoziierte Lipase.

II. Eigenschaften der Lipasen

Für die folgenden Untersuchungen einiger Eigenschaften der nach Fraktionierung von Rohhomogenaten im Saccharosedichtegradienten mit der lipolytischen Membranfraktion (Dichte 1,11 - 1.13 kg/l bei Raps bzw. 1.12 - 1.15 kg/l bei Sonnenblumen) und Glyoxysomalfraktion assoziierten Lipasen (im folgenden als mikrosomale bzw. glyoxysomale Lipase bezeichnet) wurde, soweit nicht anders angegeben, die fluorimetrische Testmethode verwendet. Als Enzymquelle diente jeweils die aus den Kotyledonen drei Tage alter, etiolierter Raps- bzw. Sonnenblumenkeimlinge isolierte lipolytische Membranfraktion (s.Kap.I.3.2.) und die glyoxysomale Rohmembranfraktion (s.Kap.IV.1.).

1. pH-Abhängigkeit der Lipaseaktivitäten

Wie aus der Abb. 5 ersichtlich, zeigten sowohl die glyoxysomalen wie die mikrosomalen Lipasen aus Raps- bzw. Sonnenblumenkotyledonen maximale Aktivität nur im alkalischen Bereich. Während in den Präparaten aus Rapskotyledonen beide Lipasen ihr Optimum bei pH 8.5 aufweisen, unterscheiden sich glyoxysomale und mikrosomale Lipase bei Sonnenblumen geringfügig. Erstere ist bei pH 9.0 maximal aktiv, letztere bei pH 8.5 und scheint auch im Sauren zwischen pH 4 - 7 die Lipolyse zu katalysieren. Diese Aktivitäten könnten aber auch auf Verunreinigung der Membranfraktion mit Phospho- bzw. Galactolipasen zurückzuführen sein, von denen eine Vielzahl bei diesen niedrigen pH-Werten ihren Wirkungsbereich haben (Brockerhoff und Jensen, 1974; Galliard, 1974).

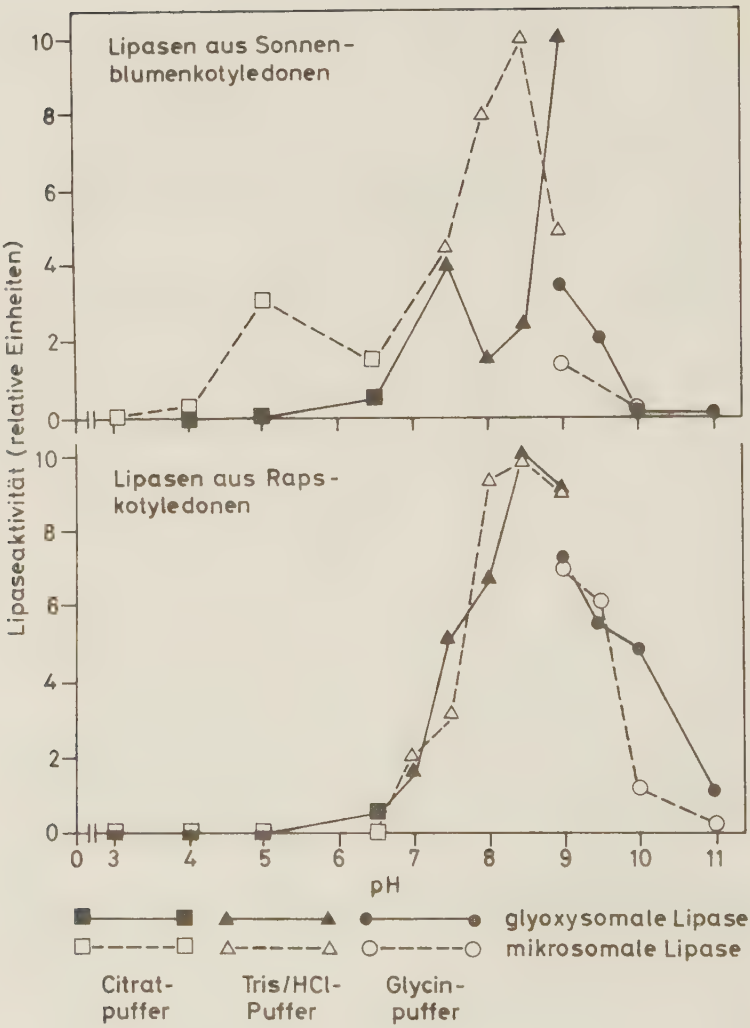

Abb.5: Abhängigkeit der Lipaseaktivitäten vom pH-Wert im Testansatz mit N-Methylindoxylmyristat als Substrat.

2. Substratselektivität der Lipasen

Die Bestimmung der Selektivität der Lipase gegenüber Tri- und Monoglyceriden erfolgte mit der colorimetrischen Testmethode nach Duncombe (1959). Dieser Test erfordert allerdings für den Nachweis von Lipaseaktivität eine ca. 4 - 10 fach höhere Proteinmenge als im fluorimetrischen Test, welcher nahezu gleiche Empfindlichkeit auf Lipase aufweist wie der colorimetrische Test mit p-Nitrophenylester langkettiger Fettsäuren. Dieser Tatbestand ist offenbar darauf zurückzuführen, daß im Test nach Duncombe (1959) nur ein Teil der enzymatisch freigesetzten Fettsäuren nachgewiesen werden kann. Wie Vorversuche zu diesem Lipasetest ergaben, konnten in Kontrollproben einer gegebenen Menge freier Fettsäuren, die in Abwesenheit von Enzymprotein dem Inkubationsgemisch zusätzlich zum Sonnenblumenöl als Substrat eingesetzt wurden, nur ca. 15%, mit Monopalmitin als Substrat nur 56% in ihre Kupfersalze überführt und folglich colorimetrisch erfaßt werden.

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, kann die mikrosomale Rapslipase, in Übereinstimmung mit Befunden von Rosnitschek und Theimer (1980), sowie die mikrosomale Lipase aus Sonnenblumenkotyledonen sowohl Tri- als auch Monoglyceride spalten. Berücksichtigt man die je nach Substrat unterschiedliche Ausbeute der tatsächlich produzierten Fettsäuren bei der Berechnung des Substratumsatzes, so ergeben sich die in Klammern gesetzten Werte. Nimmt man an, daß in vitro das Triglycerid vollständig in ein Glycerin und drei freie Fettsäuren hydrolysiert wird, so zeigen die Daten, daß auch die mikrosomale Lipase Monopalmitin

besser spalten kann als das nahezu ausschließlich aus Triglyceriden bestehende Sonnenblumenöl (Rosnitschek, 1977). Dies gilt insbesondere für die mikrosomale Lipase aus Sonnenblumenkotyledonen, die pro Mol Substrat aus dem Monoglycerid die 3 fache Menge an Fettsäuren freisetzt. Allerdings ist die Verunreinigung der lipolytischen Membranfraktion aus Sonnenblumenkotyledonen mit der glyoxysomalen Lipase (s.Kap.I.3.) offenbar so groß, daß dadurch deren relativ hoher Umsatz von Monopalmitin vorgetäuscht werden könnte.

Tab.5: Substratselektivität glyoxysomaler und mikrosomaler Lipasen aus den Kotyledonen 3 Tage alter, etiolierter Sonnenblumen- und Rapskeimlinge.

Substrat	Lipaseaktivität			
	Sonnenblumen		Raps	
	mikros.Lip	glyox.Lip	mikros.Lip	glyox.Lip
		(pkat/mg Protein)		
Triolein	-	0	545	0
Sonnenblumenöl	9,4(62)	0	794(5293)	0
Monopalmitin	103 (182)	832(1478)	3185(5664)	543(965)
p-Nitrophenylpropionat	-	354	10500	746
p-Nitrophenylmyristat	-	1773	61200	3389
		(ΔF/min·mg Protein)		
MIR	1,12	3,85	98	3,27

Die glyoxysomalen Lipasen aus Raps- wie aus Sonnenblumenkotyledonen vermögen nur Monopalmitin als Substrat zu hydrolysieren, während weder aus Sonnenblumenöl- noch Trioleinemulsionen Fettsäuren freigesetzt werden können.

Die beiden Enzyme weisen dagegen ebenso wie die mikrosomale Rapslipase, eine etwa 5 fach höhere Aktivität gegenüber dem wasserunlöslichen p-Nitrophenylester der Myristinsäure als Substrat auf als gegenüber dem vollkommen wasserlöslichen Derivat der Propionsäure, ein Charakteristikum, das sie deutlich von unspezifischen Esterasen unterscheidet (s.Kap.I.1.). Allerdings ist die Anfangsrate der Lipolyse von p-Nitrophenylmyristat durch die glyoxysomalen Lipasen nur bei niedrigen Enzymkonzentrationen über zwei Minuten konstant. Bei Zugabe hoher Enzymmengen ins Testgemisch ändert sich bereits nach 30 Sekunden die Extinktionszunahme pro Minute und setzt sich nur mehr mit einer deutlich reduzierten Rate fort (Abb.6). Dieser Effekt ist im Gegensatz zu Befunden mit dem fluorimetrischen Test mit MIM als Substrat (s. II.5.1.) durch Zugabe von DTE ins Testgemisch nicht revertierbar. Entsprechendes gilt auch für die mikrosomale Rapslipase. Allerdings tritt eine Abnahme der Lipolyserate erst nach 90 sec auf (Abb.6).

Die vorgenannten Befunde lassen sich damit erklären, daß die während der Lipolyse freigesetzten Fettsäuren im Testmedium akkumulieren und sowohl den physikalischen Zustand des in wässriger Pufferlösung dispergierten Sustrats (Galliard, 1971; Brockerhoff und Jensen, 1974) als auch möglicher-

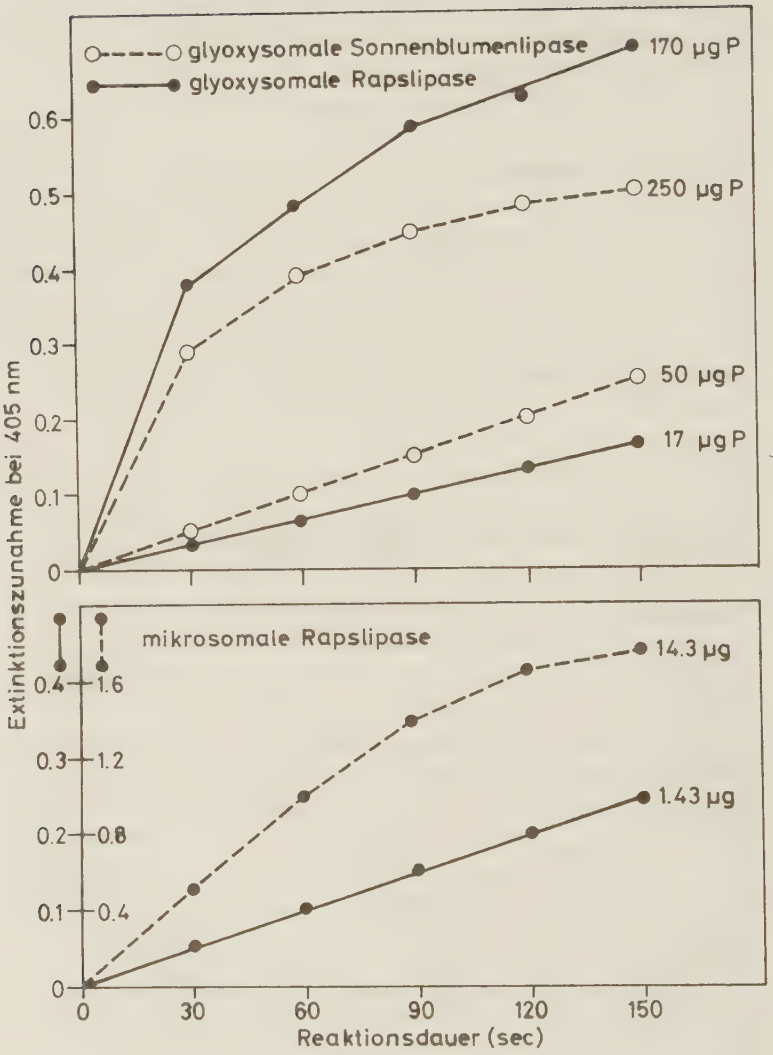

Abb.6: Anfangsrate der Lipolyse von p-Nitrophenyl-myristat durch glyoxysomale und mikrosomale Lipasen.

weise das Enzym selbst beeinflußen (Brockerhoff und Jensen, 1974; Rosnitschek und Theimer, 1980). Dagegen könnte im fluorimetrischen Test das durch die Hydrolyse von MIM entstehende N-Methylindoxyl, eine kurzlebige Verbindung mit hohem Oxydationspotential, hemmend auf die Lipase wirken, wodurch weniger Myristat als im colorimetrischen Test freigesetzt wird.

3. Einfluß freier Fettsäuren auf die Lipaseaktivitäten

Um zu prüfen, welchen Effekt die Anwesenheit freier langkettiger Fettsäuren im Testgemisch auf die apparenten Lipaseaktivitäten ausüben, wurde die fluorimetrische Testmethode angewendet, da in diesem Testsystem die im Verlauf der Enzymreaktion freigesetzten Fettsäuren offensichtlich die Lipolyserate selbst nicht beeinträchtigen (Abb.9).

Hierzu wurden die freien Fettsäuren in Äthylenglycolmonomethyläther gelöst und jeweils gleiche Volumeneinheiten unterschiedlicher Fettsäurekonzentrationen vor Reaktionsbeginn dem lipolytischen Versuchssystem hinzugegeben. Wie Abb.7 zeigt, ist die für die beiden Rapslipasen untersuchte Abnahme der Aktivität annähernd proportional der Zunahme des molaren Verhältnisses freier Fettsäuren zu MIM im Testansatz. Dagegen ist jedoch nur für die glyoxysomale Lipaseaktivität ein deutlich unterschiedlicher Hemmeffekt durch die verschiedenen Fettsäuren festzustellen, der bei der Erucasäure, einer wesentlichen Komponente des Rapsöls, am höchsten ist.

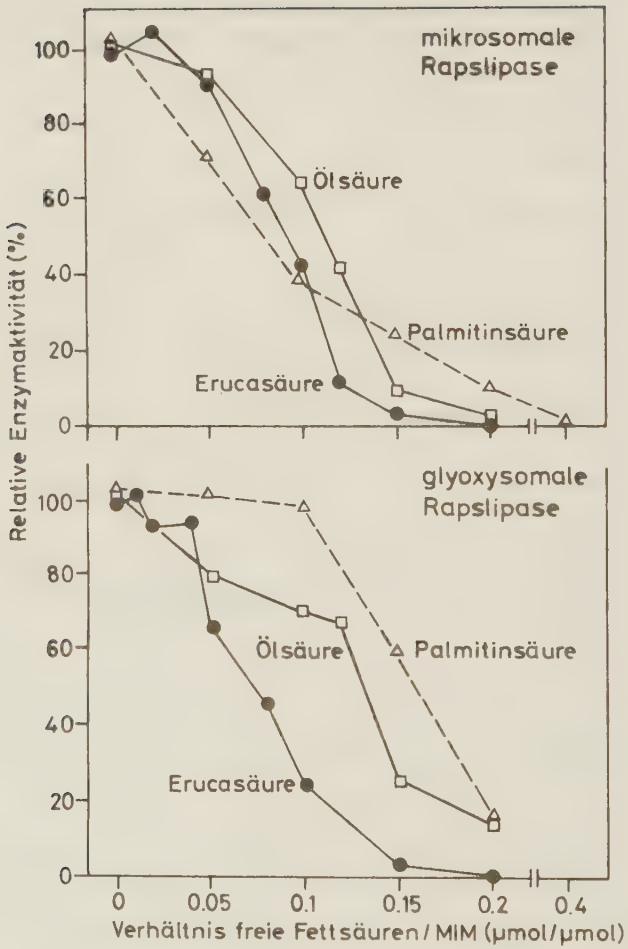

Abb.7: Einfluß freier Fettsäuren auf die Aktivitäten der glyoxysomalen und mikrosomalen Rapslipase im fluorimetrischen Test (100% = Aktivität ohne Zusatz freier Fettsäuren).

4. Apparente K_M-Werte der Lipasen

Muto und Beevers (1974) fanden für die saure Triglyceridlipase und die alkalische Monoglyceridlipase des Ricinusendosperms signifikante Unterschiede in den apparenten K_M-Werten mit MIM als Substrat, wobei letzteres Enzym eine etwa 7 fach größere Affinität zu diesem Substrat aufweist.

Wie in Abb.8 dargestellt, zeigen dagegen sowohl die mikrosomale Triglyceridlipase als auch die glyoxysomale Lipase aus Rapskotyledonen identische K_M-Werte für MIM als Substrat von etwa 160 µMol/l, die damit in der Größenordnung des K_M-Wertes der alkalischen Ricinuslipase von 230 µMol/l liegen. Für die glyoxysomale Sonnenblumenlipase ergibt sich ein sehr niedriger K_M-Wert von 67 µMol/l für MIM als Substrat, während für die mikrosomale Sonnenblumenlipase der lipolytischen Membranfraktion keine Michaeliskonstante bestimmt werden konnte, da die von diesem Enzym katalysierte Hydrolyse von MIM offenbar nicht einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik folgt.

5. Effektoren der Lipaseaktivitäten

5.1. Einfluß von DTE und p-Chloromercuriphenylsulfonsäure (PCMBS) auf die Lipaseaktivitäten

Pflanzliche Lipasen scheinen für die Katalyse bedeutsame SH-Gruppen zu besitzen (Dundas et al., 1978; Muto und Beevers, 1974; Ory, 1969; Sanders und Pattee, 1965; Singer, 1948). Daher sollte der Einfluß von DTE und PCMBS auf die Aktivität glyoxysomaler und mikrosomaler Lipasen untersucht werden.

Abb.8: Lineweaver-Burk-Plot zur Bestimmung der K_M-Werte für Lipasen.

Wie aus Abb.9 hervorgeht, sind die Reaktionsraten der glyoxysomalen Sonnenblumen- und Rapslipase im fluorimetrischen Test mit MIM als Substrat nicht konstant, und bereits nach drei Minuten ist mit ersterem Enzym keine Fluoreszenzzunahme mehr meßbar. Im Gegensatz zu den Befunden, die im colorimetrischen Test mit p-Nitrophenylmyristat erhalten wurden (s.Kap.II.2.), tritt dieser Effekt unabhängig von der eingesetzten Enzymmenge auf. Durch Zusatz von DTE zum Testgemisch kann jedoch die Anfangsrate der Lipolyse gesteigert und eine über 10 Minuten anhaltende Linearität des Aktivitätverlaufs erzielt werden, was darauf hindeutet, daß ohne DTE SH-Gruppen des Enzyms oxydiert und dieses dadurch gehemmt wird.

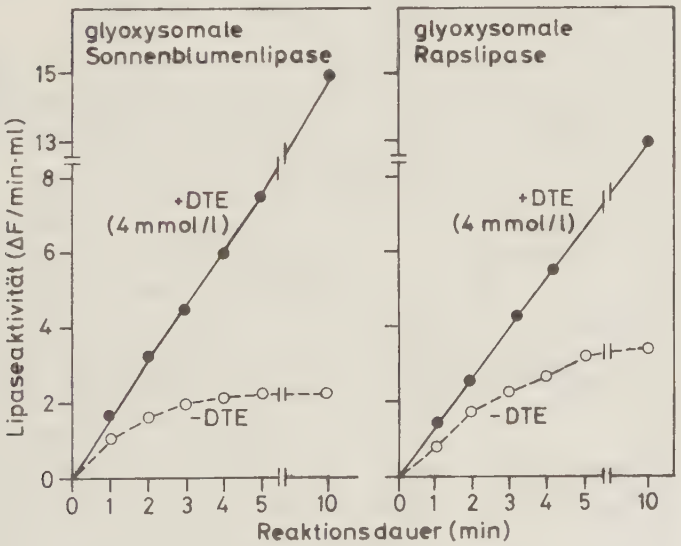

Abb.9: Einfluß von DTE auf den Aktivitätsverlauf der glyoxysomalen Lipasen im fluorimetrischen Test.

Hierfür ist offensichtlich das bei der Hydrolyse von MIM entstehende N-Methylindoxyl, eine Verbindung mit hohem Oxydationspotential, verantwortlich, da ein analoger Effekt im colorimetrischen Test mit p-Nitrophenylestern langkettiger Fettsäuren als Substrat nicht auftritt.

Entsprechend ist das SH-Gruppengift PCMBS, in Übereinstimmung mit Befunden an einer Vielzahl pflanzlicher Lipasen (s.oben), ein starker Inhibitor für die glyoxysomale Sonnenblumenlipase und die beiden Rapslipasen. Durch Zugabe von bereits 100 µmol/l PCMBS zum Testgemisch werden die Aktivitäten ersteren Enzyms bereits vollständig, letzterer Enzyme zu etwa 60% gehemmt (Tab.6).

Tab.6: Einfluß von DTE und p-Chloromercuriphenylsulfonsäure (PCMBS) auf die Lipaseaktivitäten (Werte beziehen sich auf die Anfangsrate der Lipolyse während der ersten 60 sec.).

Zugegebene Substanz	Relative Lipaseaktivitäten		
	Sonnenblume	Raps	
	glyox.Lip	glyox.Lip	mikros.Lip
DTE	100	100	100
DTE 4 mmol/l	175	176	143
PCMBS 100 µmol/l	0	40	37

5.2. Einfluß von Salzen, EDTA und Triton X-100 auf die Lipaseaktivitäten

In Tabelle 7 ist die Wirkung verschiedener Salze, von EDTA und Triton X-100 auf die Lipaseaktivitäten zusammengestellt. Mono- und Bivalente Metallionen haben keinen signifikanten Einfluß auf die Aktivitäten der beiden glyoxysomalen Lipasen.

Tab.7: Einfluß verschiedener Salze, EDTA und Triton X-100 auf die Lipaseaktivitäten.

Ionen	Konzentration im Testansatz	relative Lipaseaktivitäten(%)		
		SB	Raps	
		glyox.Lip	glyox.Lip	mikros.Lip
keine	-	100	100	100
$CaCl_2$	1 mmol/l	86	92 ±14	102 ±29
NaCl	1 mmol/l	-	95,6	100
	100 mmol/l	-	94	103
KCl	1 mmol/l	97	100	85
EDTA	1 mmol/l	91	74 ±23	12,3 ±5,8
EDTA/$CaCl_2$	1 mmol/l	-	100	108
EDTA/NaCl	1 mmol/l	-	78	5
Triton X-100	0,1 g/l	0	17	-
	0,2 g/l	0	5	-

Desgleichen wird die Aktivität der mikrosomalen Rapslipase, im Gegensatz zu Befunden von Rosnitschek und Theimer (1980), weder durch $CaCl_2$ noch durch NaCl, selbst nach einer 5-minütigen Vorinkubation des Enzyms bei 0^oC in einer 100 mmol/l NaCl-Lösung, nennenswert beeinflußt.

Dagegen ist EDTA, in Übereinstimmung mit Resultaten von Rosnitschek und Theimer (1980), ein starker Inhibitor für die mikrosomale Rapslipase. Deren Aktivität wird bei einer Konzentration von 1 mmol/l EDTA sowohl im fluorimetrischen als auch im colorimetrischen Test (mit p-Nitrophenylcaprylat als Substrat) zu 90% gehemmt, während die Aktivität der glyoxysomalen Rapslipase nur um 25% vermindert, die der glyoxysomalen Sonnenblumenlipase kaum beeinflußt wird. Die Hemmwirkung durch EDTA kann durch Zugabe äquimolarer Mengen von Ca^{2}-Ionen, dagegen nicht durch Na^{+}-Ionen revertiert werden.

Ein für die bisher untersuchten glyoxysomalen Lipasen gemeinsames Charakteristikum ist die starke Hemmwirkung von Triton X-100 bei sehr niedriger Konzentration im Testgemisch(Huang, 1975; Muto und Beevers, 1974). Dementsprechend wurde der Einfluß dieses Detergenz auf die Aktivitäten der glyoxysomalen Lipasen aus Raps- und Sonnenblumenkotyledonen untersucht. Wie aus der Tabelle 7 hervorgeht, hemmt 0,01% Triton X-100 die glyoxysomale Sonnenblumenlipase vollständig, während bei dieser Konzentration die glyoxysomale Rapslipase zu 83%, durch 0,02% Triton X-100 zu 95% gehemmt wird.

III. Entwicklung glyoxysomaler Enzymsysteme in den Kotyledonen von Raps und Sonnenblumen

1. Glyoxysomale Enzymausstattung in reifenden und ruhenden Sonnenblumensamen

Aus Kap.1 geht hervor, daß reifende bzw. ruhende Sonnenblumensamen in ihren Embryonen bereits Lipaseaktivität aufweisen. Daher sollte im folgenden untersucht werden, ob auch die bei der Keimung an der Mobilisierung der Reservefette beteiligten Glyoxysomen in diesen Stadien vorhanden sind.

Tab.8: Lipolytische und glyoxysomale Enzymaktivitäten in reifenden und ruhenden Sonnenblumensamen. Die Enzymaktivitäten wurden jeweils im Rohhomogenat gemessen.

Entwicklungsstadium	Enzymaktivität					
	CCR	HAD	ICL	MS	CAT	Lip
	(nkat/Embryo)					(ΔF/min·E.)
reifende Samen						
Embryogenesestadium						
I	-	0,072	0	0,0375	141	-
II	1050	0,538	0	0,229	418	0,031
III	920	0,8	0	0,249	247	0,046
	(nkat/Embryo)					(ΔF/min·E.)
ruhende Samen	926	2,47	0	0,536	2000	0,1
	(nkat/KP)					(ΔF/min·KP)
3 Tage alte Keimlinge	16200	3,92	3,65	4,371	26000	1,5

Wie aus Tab.8 hervorgeht, treten in den RH von Embryonen ruhender Sonnenblumensamen, die nach Entfernen der Samenschale eine Stunde auf feuchtem Filterpapier imbibiert worden waren, neben lipolytischer EA und CCR-Aktivität bereits deutlich meßbare Aktivitäten der glyoxysomalen Enzyme CAT, MS und HAD auf. Letzteres Enzym weist bereits 40%, die CAT und MS ca. 5% der maximalen Aktivität während der Keimung auf (s.Abb.14). Lediglich ICL-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

Dieselben Enzymaktivitäten finden sich bereits in den Rohhomogenaten von Embryonen reifender Samen. Diese wurden willkürlich in drei Stadien eingeteilt: Embryogenesestadium I (= ca.25 Tage nach Blühbeginn), Embryogenesestadium II (= ca.30 Tage nach Blühbeginn) und Embryogenesestadium III (=ca.35-40 Tage nach Blühbeginn.

Abb.10: Verteilung von Protein und Enzymaktivitäten im linearen Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung eines Rohhomogenats von Embryonen reifender Sonnenblumensamen ca. 30 Tage nach Blühbeginn.

1 Einheit entspricht:

Lip	0.000246	ΔF/min x Embryo
HAD	5.51	pkat/Embryo
MS	1.59	pkat/Embryo
ICL	0.69	pkat/Embryo
FUM	2.15	nkat/Embryo
CCR	18.4	nkat/Embryo
CAT	3.94	nkat/Embryo
Prot	3.9	µg/Embryo
Saccharose	108	g/l

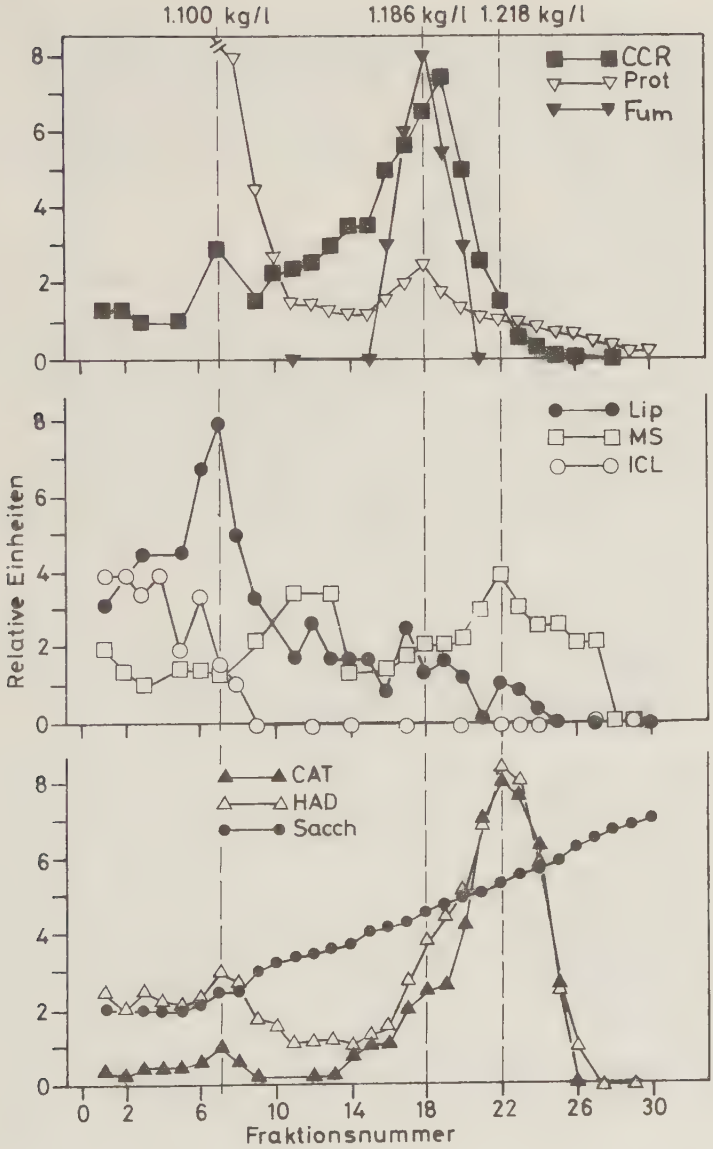
1.100 kg/l
1.186 kg/l
1.218 kg/l
CCR
Prot
Fum
Lip
MS
ICL
CAT
HAD
Sacch
Relative Einheiten
Fraktionsnummer
0
2
4
6
8
10
14
18
22
26
30

Abb. 10

Um zu überprüfen, ob diese Enzymaktivitäten in den Embryonen bereits in Glyoxysomen kompartimentiert sind, wurden die Rohhomogenate im Saccharosedichtegradienten in die partikulären Zellfraktionen aufgetrennt.

In Abb.10 sind für einen typischen Gradienten die Verteilungsprofile partikulärer Leitenzyme nach Zentrifugation des Rohhomogenats von Embryonen des Entwicklungsstadiums II dargestellt. Stets sedimentierten 40 - 60% der partikulären Aktivitäten von CAT und HAD zusammen in einer scharfen Bande mit der Schwebedichte von 1.20 - 1.24 kg/l, die jener intakter Glyoxysomen aus den Kotyledonen 24 Stunden alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge entspricht (Abb.11). Zwar überlappend, aber deutlich davon verschieden ist die Lage der Mitochondrien im Gradienten bei einer Schwebedichte um 1.19 kg/l, ersichtlich aus dem steilen Aktivitätsmaximum von FUM. Mit ihm überlappt der Aktivitätsgipfel von CCR, während ein zusätzliches kleines Maximum in einem Dichtebereich um 1.10 kg/l auftritt.

Das Verteilungsprofil von MS weist zwei etwa gleich große, breite Aktivitätsgipfel bei den Schwebedichten 1.15 kg/l und 1.22 kg/l auf, wobei letzterer mit dem von CAT und HAD zusammenfällt. Die Aktivität des zweiten Schlüsselenzyms des Glyoxylsäurezyclus, ICL, ließ sich im Gegensatz zu den Rohhomogenaten nach der Gradientenzentrifugation zwar bestimmen; ICL scheint aber nicht an Partikel gebunden zu sein oder sehr leicht abgelöst zu werden, da geringe Aktivitäten stets nur im Überstand des Gradienten nachweisbar waren (Abb.10).

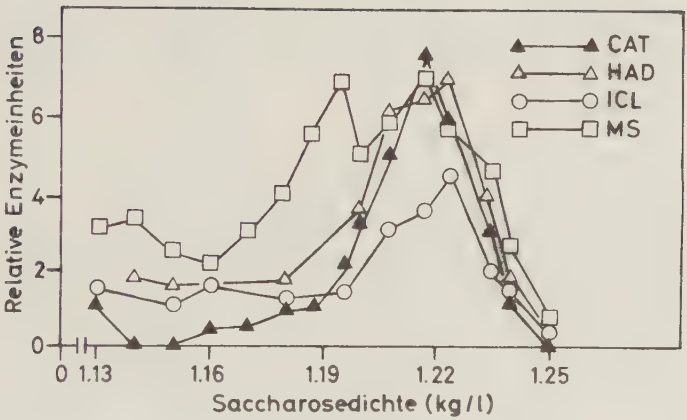

Abb.11: Verteilung glyoxysomaler Enzymaktivitäten im linearen Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung eines Rohhomogenats von Kotyledonen 24 Stunden alter Sonnenblumenkeimlinge.

1 Einheit entspricht:

CAT	18	nkat/KP
HAD	10.4	pkat/KP
MS	6.1	pkat/KP
ICL	2.4	pkat/KP

Dagegen sedimentiert ein geringer Anteil (ca. 5 - 8%) der Lipaseaktivität bereits mit der Glyoxysomalfraktion (Dichte um 1.21 kg/l), während der Hauptanteil an der Interphase zwischen Überstand und Gradientensaccharose verbleibt.

Auch nach Zentrifugation eines Rohhomogenats von Embryonen des Stadiums III im Saccharosedichtegradienten wurde eine Glyoxysomalfraktion von einer Mitochondrienfraktion abgetrennt. Abb.12 zeigt die Verteilungsprofile der Leitenzymaktivitäten in einem typischen Gradienten. Wiederum sedimentierte die Mitochondrialfraktion bei einer Schwebedichte von 1.19 kg/l, die Glyoxysomalfraktion dagegen bei ca. 1.23 kg/l.

Abb. 12: Verteilung von Protein und Enzymaktivitäten im linearen Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung eines Rohhomogenats von Embryonen reifender Sonnenblumensamen ca. 35 - 40 Tage nach Blühbeginn.

1 Einheit entspricht:

Lip	0.000327	ΔF/min x Embryo
HAD	5.4	pkat/Embryo
CAT	5.43	nkat/Embryo
MS	0.735	pkat/Embryo
ICL	0.15	pkat/Embryo
FUM	3.15	pkat/Embryo
CCR	9.03	pkat/Embryo
Prot	4.87	µg/Embryo
Saccharose	108	g/l

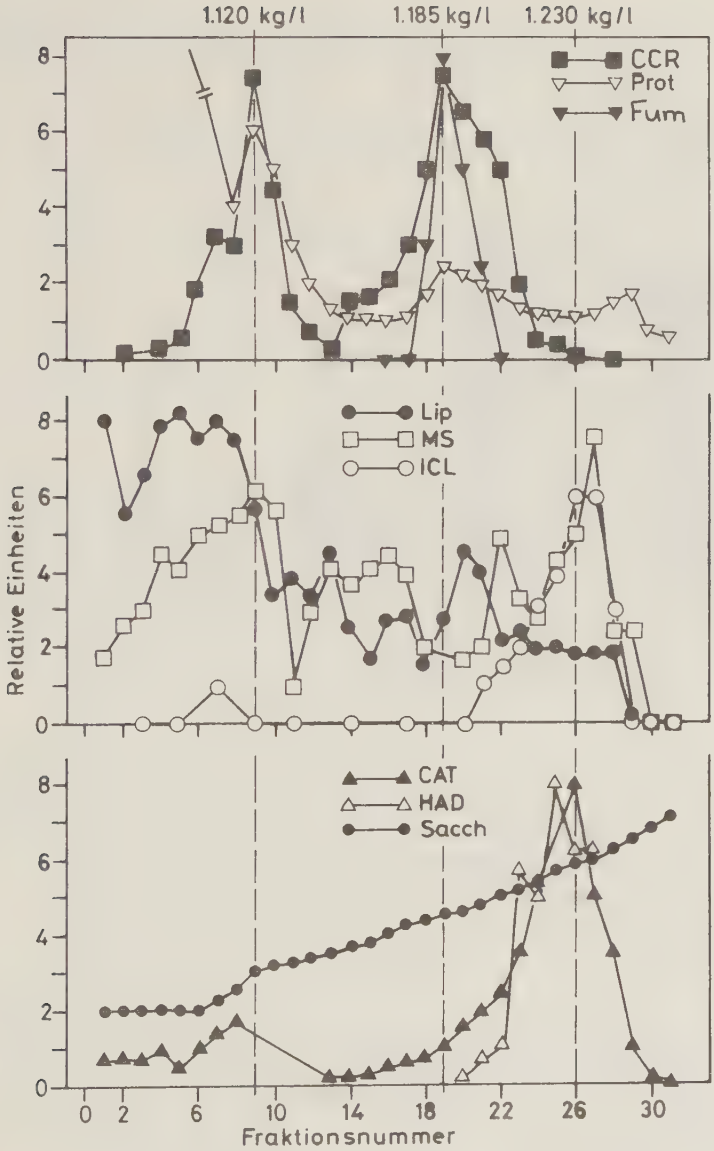
1.120 kg/l
1.185 kg/l
1.230 kg/l
CCR
Prot
Fum
Lip
MS
ICL
CAT
HAD
Sacch
Relative Einheiten
Fraktionsnummer
0
2
4
6
8
10
14
18
22
26
30

Abb. 12

Im Gegensatz zu den Embryonen der vorhergehenden Stadien besitzen die Microbodies im Stadium III der Embryogenese nun zusätzlich zu Lipase-, MS-, CAT- und HAD- auch noch ICL-Aktivität, scheinen also funktionstüchtige Glyoxysomen zu sein.

Die sukzessive Vervollständigung der glyoxysomalen Enzymausstattung im Verlaufe der Reifung der Sonnenblumensamen wird deutlich, wenn man die spezifischen Aktivitäten typischer glyoxysomaler Enzyme in der Microbody-Fraktion aus Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien mit denen nach Beginn der Keimung vergleicht.

So zeigt Abb.13, daß die Aktivitäten von HAD und CAT in allen Stadien in vergleichbarer Höhe vorhanden sind. Die Aktivitäten der alkalischen Lipase und MS nehmen im Verlauf der Reifung von Stadium I nach III allmählich zu. Korrespondierend mit diesem Anstieg der spezifischen Aktivität nimmt der prozentuale Anteil der MS-Aktivität in der Microbodyfraktion von 5% (Stadium I) auf etwa 30% (Stadium II und III) zu; allerdings betrug die Ausbeute der MS-Aktivität nach Saccharosedichtezentrifugation stets nur 30%, während für die übrigen Enzyme mehr als 70% der auf die Gradienten aufgetragenen Enzymaktivität wiedergefunden werden konnten. ICL tritt erst im letzten Stadium in der Glyoxysomalfraktion mit geringer Aktivität auf. Am ersten Tag nach Keimungsbeginn ist ihre Aktivität dann verdreifacht, während die der anderen glyoxysomalen Enzymaktivitäten nur mehr geringfügig verändert wird. Zu Beginn der Keimung liegt in den Sonnenblumenkotyledonen also bereits eine arbeitsfähige, im Verlauf der Reifung schrittweise differenzierte Glyoxysomenpopulation vor.

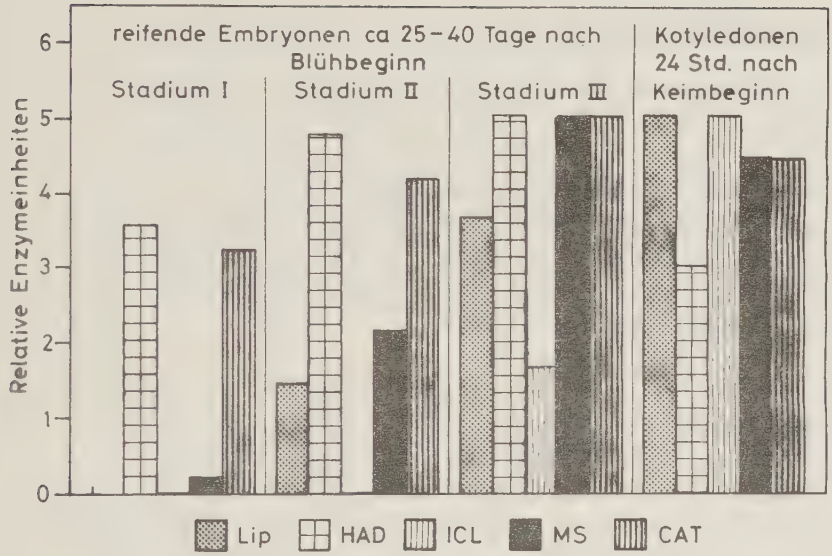

Abb.13: Spezifische Aktivitäten glyoxysomaler Enzyme in den Microbodyfraktionen aus den Embryonen reifender Sonnenblumensamen ca. 25-40 Tage nach Blühbeginn und aus Kotyledonen 24 h gekeimter Sonnenblumensamen.

1 Einheit entspricht:

Lip	0.0288	(ΔF/min x mg P)
HAD	1.186	(nkat/mg P)
ICL	0.091	(nkat/mg P)
MS	0.270	(nkat/mg P)
CAT	1.568	(μkat/mg P)

2. Entwicklung glyoxysomaler Enzymsysteme während der Keimung im Dunkeln

2.1. Änderung der Gesamtaktivität

Die schrittweise Veränderung der Enzymausstattung der Glyoxysomen im Verlauf der Samenreifung legt nahe zu überprüfen, ob bei Keimung und Keimlingsentwicklung sich diese mit dem zunehmenden Verbrauch der Reservefette ebenfalls ändert. Dazu wurden Raps und Sonnenblumen im Dunkeln auf Vermiculit angezogen und in den Rohhomogenaten der Kotyledonen die Enzymaktivitäten bestimmt.

Der Verlauf der Entwicklung charakteristischer Enzymaktivitäten während der ersten 8 Tage des Wachstums von Sonnenblumenkeimlingen ist in Abb.14 dargestellt. Obwohl in reifenden Samen ICL-Aktivität nachgewiesen werden konnte, weisen Rohhomogenate ruhender Samen kurz nach der Imbibition keine apparente Aktivität dieses Enzyms auf. Alle anderen glyoxysomalen Enzym-

---

Abb.14: Verlauf der Entwicklung glyoxysomaler Enzymaktivitäten in den Kotyledonen etiolierter Sonnenblumenkeimlinge (in den Rohhomogenaten bestimmt). Die angegebenen Werte sind das Mittel (±Standardabweichung) aus mehreren unabhängigen Versuchsreihen.

1 Einheit entspricht:

HAD	654	pkat/KP
THIOL	792	pkat/KP
ICL	440	pkat/KP
MS	850	pkat/KP
CAT	4.3	µkat/KP
HPR	70	pkat/KP

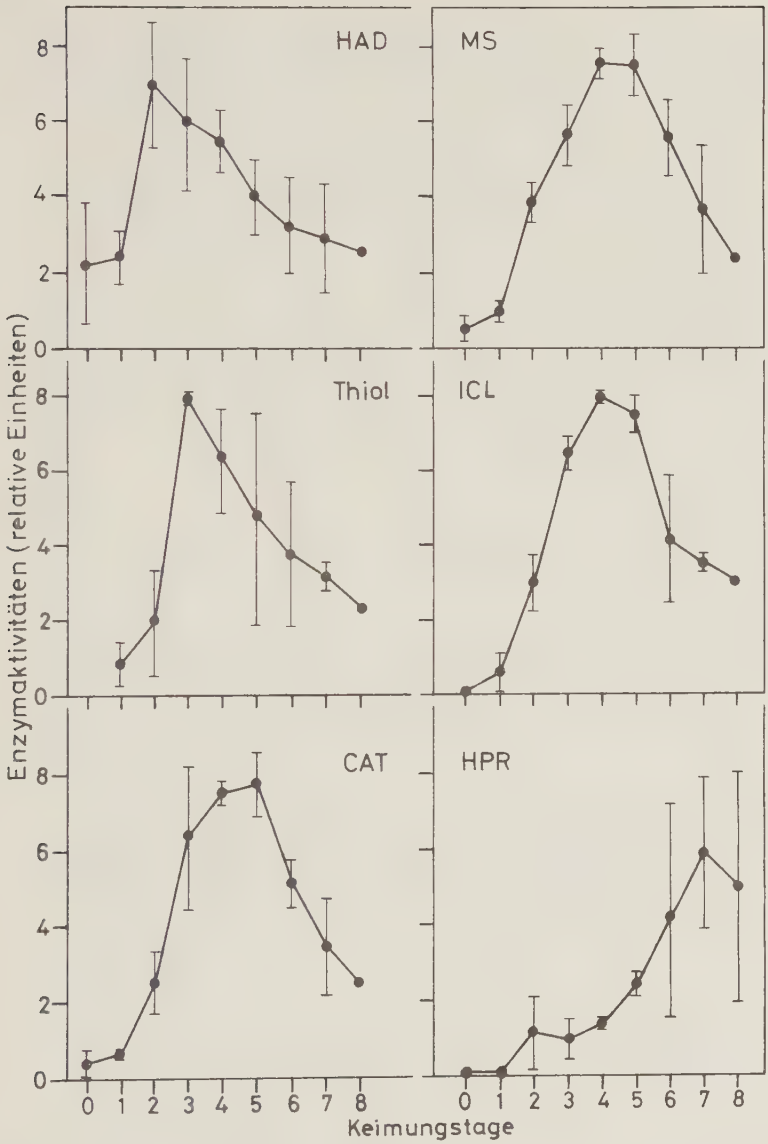
HAD
MS
Thiol
ICL
CAT
HPR
Enzymaktivitäten (relative Einheiten)
Keimungstage
0
2
4
6
8
0 1 2 3 4 5 6 7 8

Abb. 14

aktivitäen treten auf (s.Tab.8). Erst 24 Stunden nach Keimbeginn wird ICL wieder nachweisbar, während die übrigen glyoxysomalen Enzyme nicht wesentlich an Aktivität zunehmen. Dabei lassen sich drei Gruppen von Enzymaktivitäten abgliedern, die in zeitlicher Folge nacheinander ihr Aktivitätsmaximum erreichen. Die Leitenzyme für die ß-Oxydation der Fettsäuren, ß-Ketothiolase und ß-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase, finden sich bereits zu Beginn in relativ hohen Aktivitäten und durchlaufen dieses Maximum am 2. bis 3. Tag nach Aussaat der Samen. Zu diesem Zeitpunkt erreichen die Schlüsselenzyme des Glyoxylsäurezyclus (ICL und MS) erst ca. 50% ihrer höchsten Aktivitäten, die am 4. bis 5. Tag zusammen mit der von CAT auftreten.

Dagegen fehlt das bei Sonnenblumen auch im Dunkeln bereits mit relativ geringer Aktivität auftretende Leitenzym der Blattperoxisomen, HPR, in den beiden ersten Tagen völlig, nimmt dann allmählich an Aktivität zu und tritt erst am 6.-7. Tag in ein Maximum, während es am 5. Tag etwa mit 50% dieser Aktivität gefunden wurde.

Abb.15: Verlauf der Entwicklung glyoxysomaler Enzymaktivitäten in den Kotyledonen etiolierter Rapskeimlinge (in den Rohhomogenaten bestimmt). Die angegebenen Werte sind das Mittel (±Standardabweichung) aus 2 unabhängigen Versuchsreihen.

1 Einheit entspricht:

HAD	13	pkat/KP
THIOL	32.5	pkat/KP
ICL	62.5	pkat/KP
MS	67	pkat/KP
CAT	110	nkat/KP
HPR	168	pkat/KP

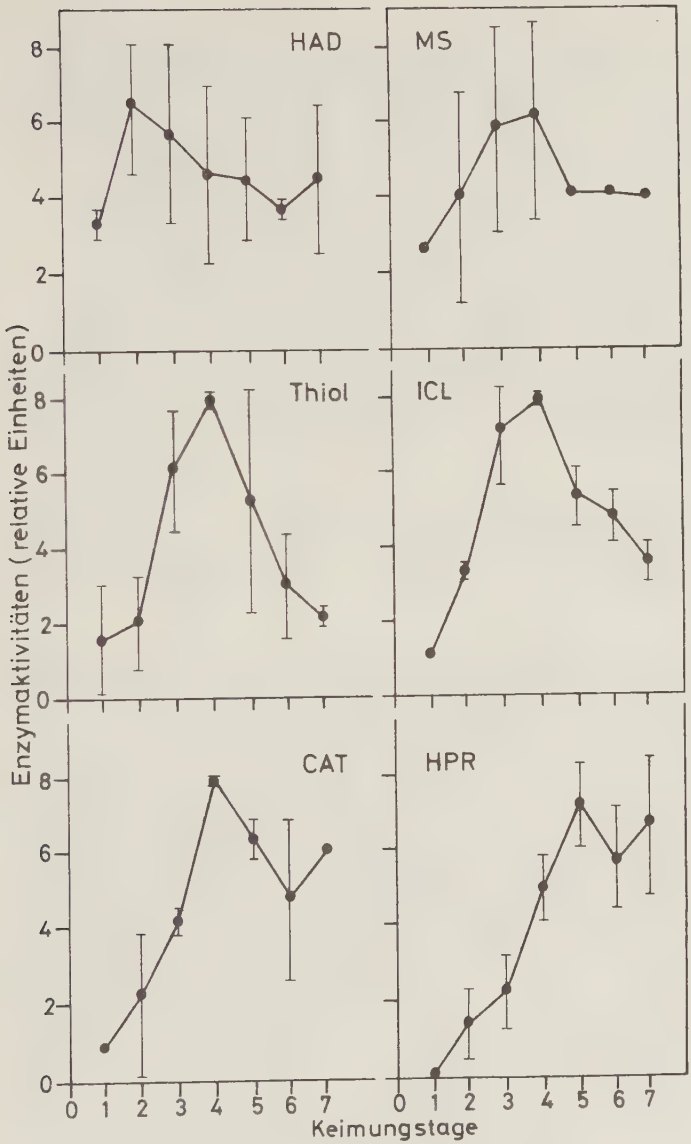
HAD
MS
Thiol
ICL
CAT
HPR
Enzymaktivitäten (relative Einheiten)
Keimungstage
0
2
4
6
8
0 1 2 3 4 5 6 7

Abb. 15

Etwas unterschiedliche Verhältnisse finden sich bei der Entwicklung der glyoxysomalen Enzymaktivitäten beim keimenden Raps (Abb.15). Schon 24 Stunden nach Keimungsbeginn ist ca. 50% der maximalen HAD-Aktivität, die einen Tag später erreicht wird, vorhanden. Thiol-Aktivität nimmt dagegen noch bis zum 4. Tag kräftig zu, wo sie gemeinsam mit den Schlüsselenzymen des Glyoxylsäurezyclus, ICL und MS, und Katalase ihr Aktivitätsmaximum in den Kotyledonen erreicht. Die Entwicklung der HPR-Aktivität verläuft dagegen wie bei Sonnenblumen langsamer; erst am 5. Tag findet sich in den Rohhomogenaten optimale Aktivität. Außerdem verschwinden die glyoxysomalen Enzymaktivitäten aus den Rapskotyledonen nur sehr zögernd, so daß selbst 7 Tage nach Keimungsbeginn noch 60 - 70% der maximalen Aktivitäten von HAD, CAT und MS und rund 45% der ICL nachweisbar sind. Lediglich die Thiol-Aktivität ist dann bereits auf 25% reduziert.

2.2. Änderung der Enzymausstattung in den Glyoxysomen

Der unterschiedliche Verlauf der Entwicklung der Enzymaktivitäten des Glyoxylsäurezyklus und der β-Oxydation der Fettsäuren könnte auch durch abweichendes Auftreten von Isoenzymen von HAD und Thiol in anderen Zellkompartimenten außerhalb der Glyoxysomen vorgetäuscht werden, da im Rohhomogenat gemessen worden war (Abb.14). Daher wurden aus Rohhomogenaten von Kotyledonen verschieden alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge im Saccharosedichtegradienten die Glyoxysomalfraktion abgetrennt und der Gehalt der einschlägigen Enzymaktivitäten bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abb.16 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß 2 und 3 Tage nach Keimungsbeginn Glyoxysomen mit maximalen Aktivitäten der Enzyme der β-Oxydation der Fettsäuren sowie alk. Lipase auftreten, wohingegen die Aktivitäten der Enzyme des Glyoxylsäurezyklus und der CAT noch weiter zunehmen. Erst am Tag 5 erreichen letztere Enzyme höchste Aktivitäten, während alk. Lipase und Thiol nur mehr 40%, HAD nur mehr 25% der maximalen Aktivitäten aufweisen. HPR-Aktivität steigt zwischen dem 3. und 4. Keimungstag kräftig an und nimmt in den Glyoxysomalfraktionen danach nur relativ langsam weiter zu.

Die Daten zeigen somit eine schrittweise Veränderung der Enzymausstattung der Glyoxysomalfraktion auch im Verlauf der Keimung.

Wie der Vergleich der Abb. 14 und 16 zeigt, verläuft allerdings die Abnahme der Aktivitäten von Lipase, HAD und Thiol in den Glyoxysomalfraktionen deutlich schneller als dies gemäß dem Verschwinden ihrer Gesamtaktivitäten in den Rohhomogenaten der Kotyledonen zu erwarten wäre. Um die Gründe dieser Diskrepanz näher zu untersuchen, wurde die Verteilung glyoxysomaler Enzymaktivitäten im Saccharosedichtegradienten und in dessen Überstand nach Zentrifugation der Rohhomogenate von Kotyledonen 3 und 5 Tage alter Sonnenblumenkeimlinge bestimmt.

Die Daten zweier typischer Zellfraktionierungen sind in Abb. 17 dargestellt. Zwischen Tag 3 und 5 nach Keimbeginn nimmt die Gesamtaktivität von HAD in den Kotyledonen um 35% ab (Abb.14); vergleicht man die gesamten in den Saccharosedichtegradienten

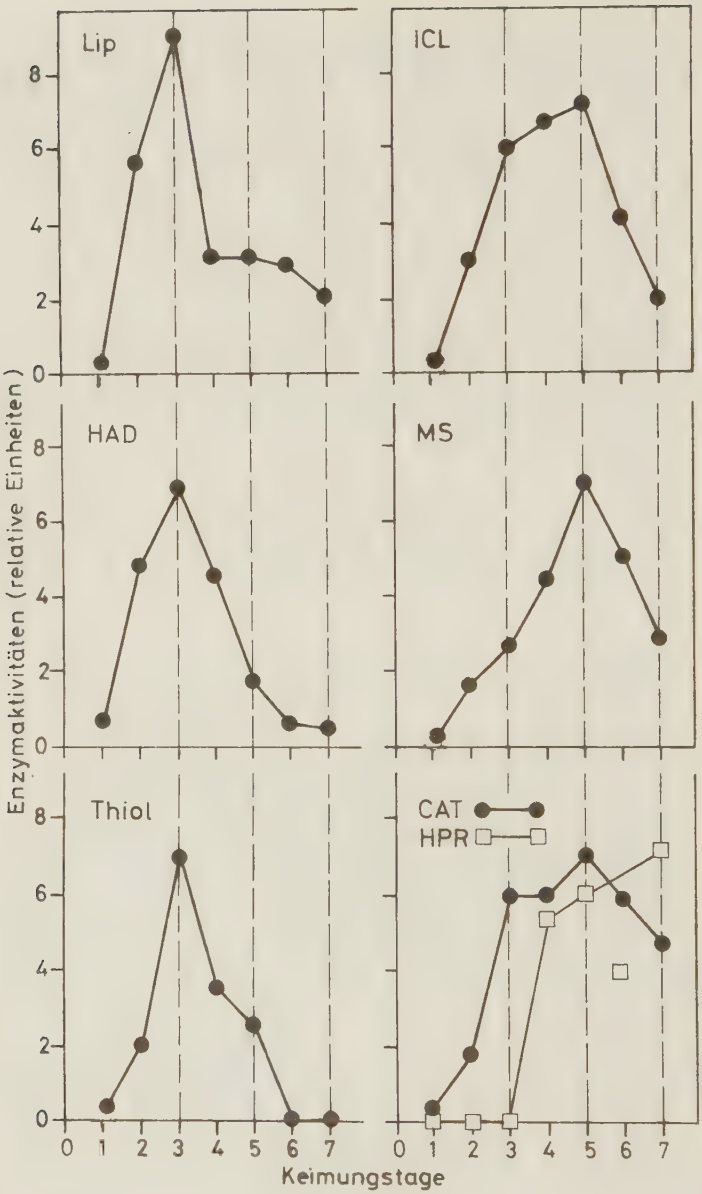
Lip
ICL
HAD
MS
Thiol
CAT
HPR
Enzymaktivitäten (relative Einheiten)
Keimungstage
0
2
4
6
8
0 1 2 3 4 5 6 7

Abb. 16

Abb.16: Änderung der Enzymaktivitäten in den Glyoxysomalfraktionen von Sonnenblumenkotyledonen während der Keimung im Dunkeln. Die Isolierung erfolgte durch Fraktionierung der jeweiligen Rohhomogenate durch kontinuierliche Saccharosedichtegradientenzentrifugation.

1 Einheit entspricht:

Lip	0.049	ΔF/min x KP
HAD	268	pkat/KP
Thiol	14.7	pkat/KP
ICL	105	pkat/KP
MS	321	pkat/KP
CAT	1.71	µkat/KP
HPR	107	pkat/KP

Abb.17: Verteilungsprofil glyoxysomaler und mitochondrionaler Enzymaktivitäten im Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung von Rohhomogenaten der Kotyledonen 3 und 5 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge.

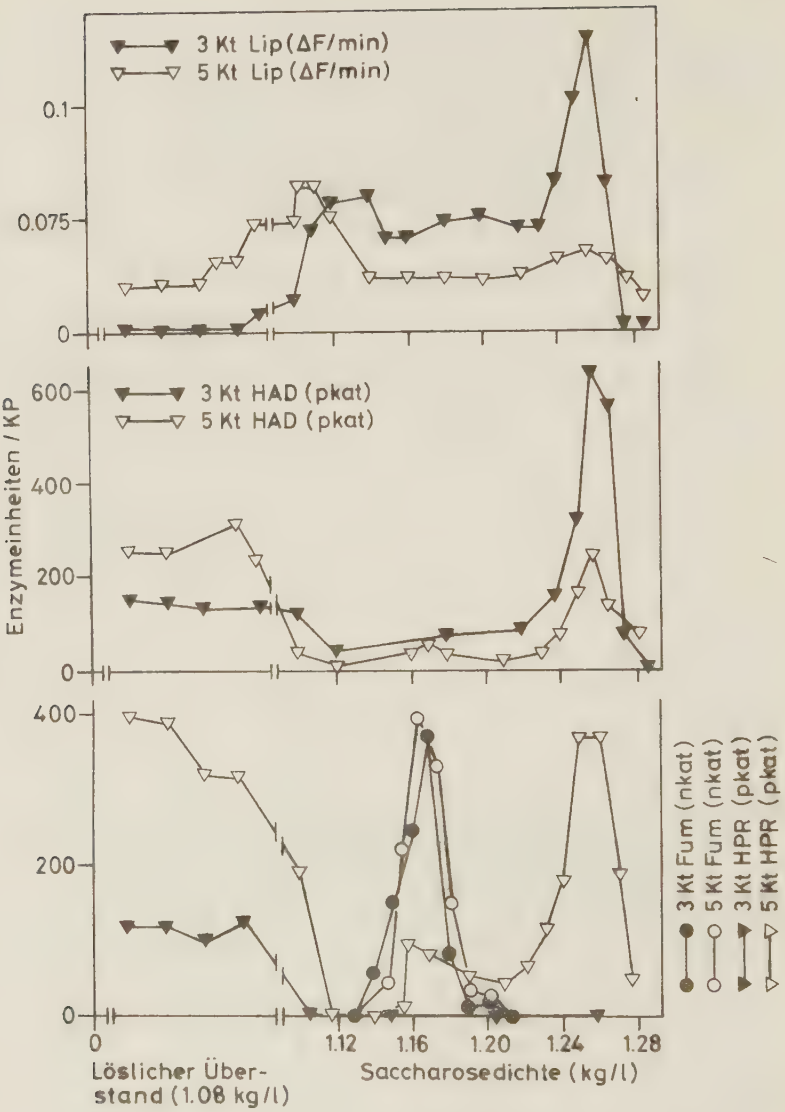
3 Kt Lip(ΔF/min)
5 Kt Lip (ΔF/min)
0.1
0.075
0
3 Kt HAD (pkat)
5 Kt HAD (pkat)
Enzymeinheiten / KP
600
400
200
0
400
200
0
3 Kt Fum (nkat)
5 Kt Fum (nkat)
3 Kt HPR (pkat)
5 Kt HPR (pkat)
0
1.12
1.16
1.20
1.24
1.28
Löslicher Überstand (1.08 kg/l)
Saccharosedichte (kg/l)

Abb. 17

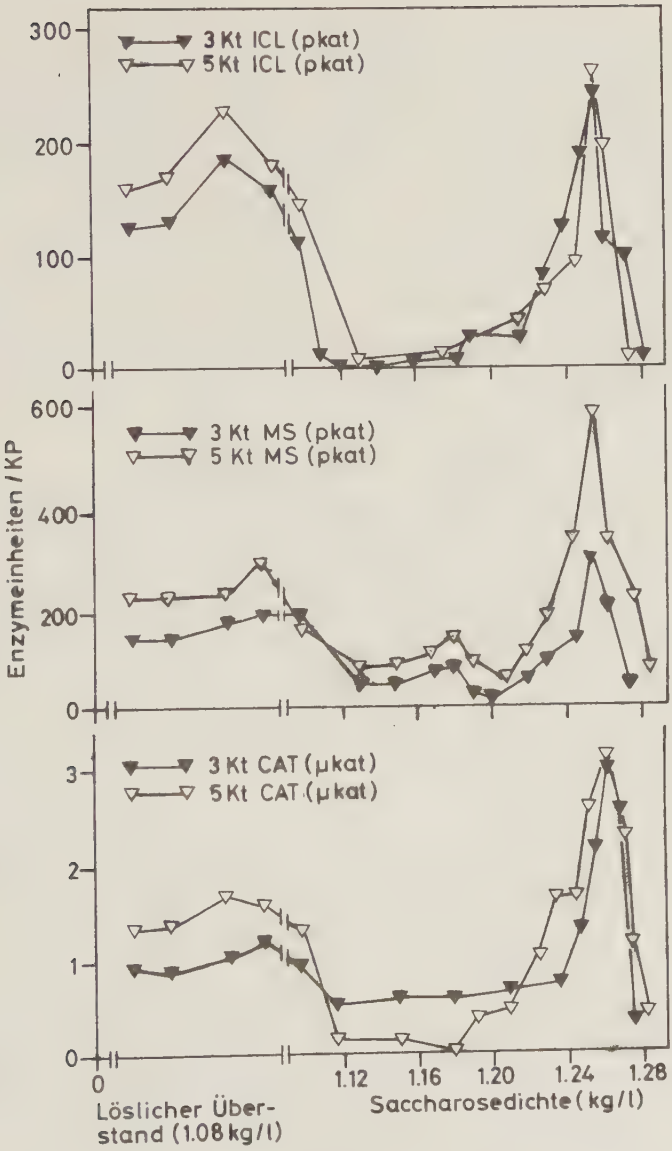
3 Kt ICL (pkat)
5 Kt ICL (pkat)
300
200
100
0
3 Kt MS (pkat)
5 Kt MS (pkat)
600
400
200
0
Enzymeinheiten / KP
3 Kt CAT (µkat)
5 Kt CAT (µkat)
3
2
1
0
1.12
1.16
1.20
1.24
1.28
Saccharosedichte (kg/l)
Löslicher Überstand (1.08 kg/l)

Abb. 17

wiedergefundenen Aktivitäten von HAD, so ergibt sich in Übereinstimmung damit eine Abnahme um 32%. Aus der Glyoxysomalfraktion dagegen verschwinden in diesem Zeitraum etwa 60% der Aktivität vom Tag 3, bei gleichzeitiger kräftiger Zunahme von HAD-Aktivität in der löslichen Fraktion im Überstand des Gradienten. Die Aktivität von MS dagegen, die von Tag 3 nach 5 in den Kotyledonen um ca. 35% zunimmt, steigt sowohl in der löslichen als auch in der glyoxysomalen Fraktion deutlich an. CAT und ICL zeigen in diesem Zeitraum nur geringe Änderungen der Gesamtaktivität und demgemäß überdecken sich auch die Verteilungsprofile weitgehend.
Die Gesamtaktivität von HPR nimmt in diesem Zeitraum in den Kotyledonen kräftig zu. Bezeichnenderweise besitzen die Glyoxysomalfraktionen etiolierter, 3 Tage alter Kotyledonen keine HPR-Aktivität; sie finden sich vollständig in der löslichen Fraktion wieder. Am Tag 5 dagegen sind in beiden Zellfraktionen hohe HPR-Aktivitäten zu messen. Die Daten zeigen somit deutlich, daß mit der Änderung der Enzymaktivitäten im Verlauf der Keimung auch ihre Assoziation mit der Glyoxysomalfraktion charakteristische Unterschiede aufweist.

Solche Veränderungen des sedimentierbaren Anteils der glyoxysomalen Gesamtenzymaktivitäten trennen diese in zwei Gruppen, wie dies aus Abb.18 klar ersichtlich ist: Der Prozentsatz an Glyoxysomen gebundener Aktivitäten von HAD und Thiol nimmt bis Tag 3 zu und danach wieder drastisch ab. Im Gegensatz dazu bleibt nach Erreichen der maximalen Sedimentierbarkeit am 3.Keimungstag der Anteil von CAT, ICL und MS in der Glyoxysomalfraktion praktisch konstant.

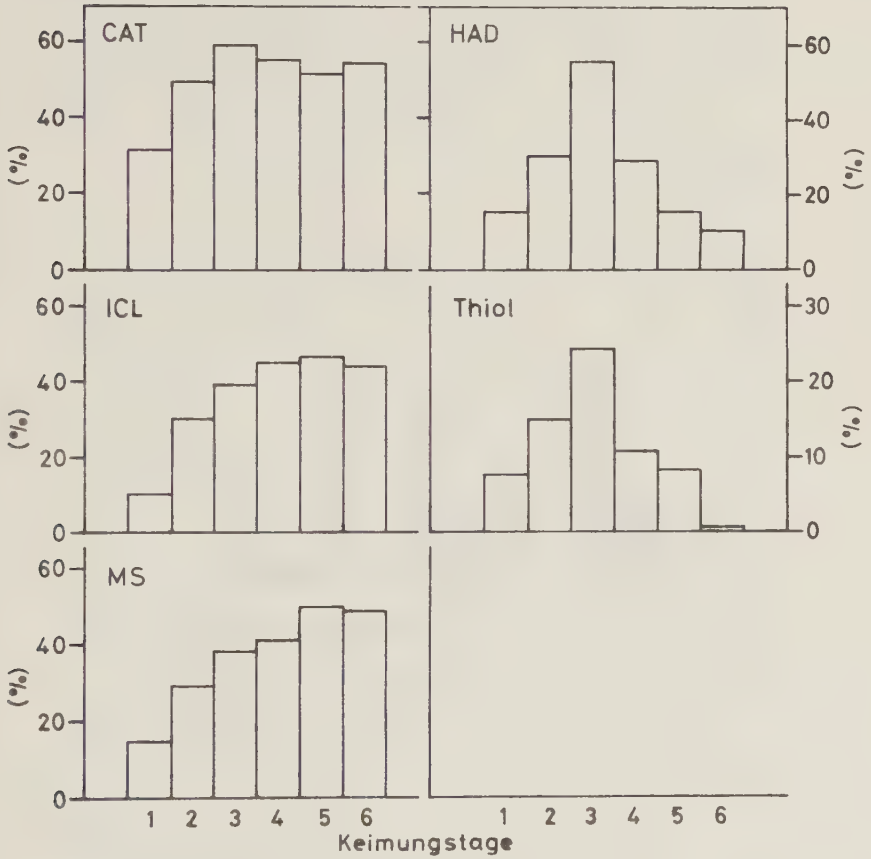

Abb.18: Änderung der Pelletierbarkeit glyoxysomaler Enzymaktivitäten mit der Glyoxysomalfraktion im Verlauf der Keimung nach Fraktionierung von Rohhomogenaten der Kotyledonen etiolierter Sonnenblumenkeimlinge durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation (100% = Summe der Aktivitäten in Überstand und Glyoxysomalfraktion des Gradienten).

Der lösliche Anteil der Thiolaseaktivität ist jedoch stets höher als der der übrigen glyoxysomalen Enzyme, was möglicherweise auf das Vorkommen eines cytoplasmatischen Isoenzyms zurückzuführen ist, welches sich funktionell von dem der ß-Oxydation der Fettsäuren unterscheidet (Middleton, 1973). Wie das Verteilungsprofil der HAD-Aktivität im Saccharosedichtegradienten nach Auftrennung von Rohhomogenaten 3 und 5 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge ferner zeigt (Abb.17), geht die Abnahme der Aktivität in der Glyoxysomalfraktion nur mit einer Zunahme in der löslichen Fraktion des Gradienten einher, während sich unverändert nur etwa 15% der aufgetragenen Aktivitäten in den übrigen Fraktionen des Gradienten wiederfinden. Stets tritt das Aktivitätsmaximum, koinzidierend mit dem der Enzyme des Glyoxylsäurezyclus und der CAT bei einer Dichte von 1.266 kg/l auf.

Die Mitochondrienfraktionen bei einer mittleren Dichte von 1.175 kg/l, ersichtlich aus dem Verteilungsprofil der FUM-Aktivität, weisen nur geringe Aktivitäten der glyoxysomalen Enzyme sowie der HAD auf. Analog den Befunden bei Raps (s.Kap.I.3.2.), dürfte diese Aktivität der HAD folglich auf eine Kontamination der Mitochondrienfraktion mit beschädigten Glyoxysomen zurückzuführen sein.

Ebenso schließt das Verteilungsmuster der Aktivitäten des Fettsäure-ß-Oxydationskomplexes im Saccharosedichtegradienten eine zusätzliche Lokalisierung der ß-Oxydation der Fettsäuren in den Mitochondrien aus, im Gegensatz zu Befunden für Maisscutella (Longo und Longo, 1975), Candida tropicalis (Kawamoto und Fukui, 1978) und Rattenleber (Lazarow, 1978). Wie die Abb.19

zeigt, sedimentierten 59% der Aktivitäten mit der Glyoxysomalfraktion, 36% verblieben in den löslichen Fraktionen des Gradienten und nur 5% fanden sich in den restlichen Fraktionen des Gradienten wieder. Dieser Anteil ist sogar noch niedriger als jener der typisch glyoxysomalen Enzyme.

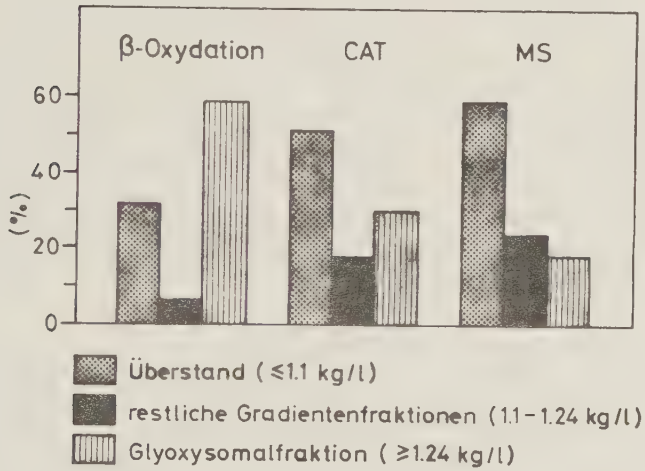

Abb.19: Relative Verteilung der Aktivitäten des Fettsäure-β-Oxydationskomplexes nach Fraktionierung eines Rohhomogenats von Kotyledonen 2 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge durch Saccharose-dichtegradientenzentrifugation. Summe der Aktivitäten im Überstand und in den Gradientenfraktionen ≙ 100%.

IV. Intrapartikuläre Lokalisation glyoxysomaler Enzymsysteme

Wie im vorangehenden Kapitel dargelegt wurde, tritt im Verlauf der Keimung eine wechselnde Assoziierung der Enzymaktivitäten der ß-Oxydation der Fettsäuren mit den Glyoxysomen auf, während MS, ICL und CAT sich stets zu einem konstanten Prozentsatz in der Glyoxysomalfraktion wiederfinden. Dies könnte durch eine unterschiedliche intrapartikuläre Lokalisation der beiden Enzymgruppen (ß-Oxydation, Glyoxylsäurezyklus) hervorgerufen sein. Daher sollte die Assoziierung dieser Enzymaktivitäten mit den beiden unterschiedlichen Glyoxysomenstrukturen, nämlich Matrix und Membran näher untersucht werden. Weitere Innenstrukturen sind nicht bekannt; der gelegentlich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen gesehene kristalloide Einschluß konnte bislang noch nicht isoliert werden, da er möglicherweise in Lösung geht.

Als Grundlage für eine Aussage über die intrapartikuläre Lokalisation eines Microbodyenzyms im Organell wird dessen Solubilisierungsgrad nach osmotischer Schockbehandlung der im Saccharosedichtegradienten isolierten, intakten, jedoch sehr fragilen Organellen genommen. Demnach sind solche Enzyme in der glyoxysomalen Matrix lokalisiert, die nach osmotischer Lyse der Microbodyfraktion und anschließender etwa 30 minütiger Zentrifugation in einem durchschnittlichen Schwerefeld von $\geq$ 40 000 x g überwiegend in der löslichen (= Matrix) Fraktion verbleiben. Dagegen gelten Enzyme als membranassoziiert, deren Aktivitäten in der resultierenden Rohmembranfraktion niedergeschlagen werden und gegenüber den intakten Organellen angereichert vorliegen.

Eine weitere Reinigung membranassoziierter Enzyme gelingt durch Auftrennung dieses Sediments bzw. der osmotisch geschockten Organellfraktion durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation, wobei die matrixfreien Membranvesikel der Glyoxysomen ("ghosts") sowie die damit assoziierten Enzyme in einem Dichtebereich sedimentieren, der deutlich verschieden ist von der Schwebedichte der intakten Organellen (Biegelmayer et al., 1973; Huang und Beevers, 1973; Huang und Moreau, 1978).

1. Osmotische Lyse der Glyoxysomen

Zunächst wurden aus Rohhomogenaten von Kotyledonen 3 Tage alter, etiolierter Sonnenblumen- und Rapskeimlinge im Saccharosedichtegradienten Glyoxysomalfraktionen gewonnen. Diese wurden durch tropfenweise Zugabe von Puffer unter Rühren bei $0^{o}C$ verdünnt. Die resultierende Suspension wurde 30 Minuten bei 129 000 x g abzentrifugiert, um die leeren Membranvesikel von den herausgelösten Matrixproteinen zu trennen. Die resultierende Fraktionierung der glyoxysomalen Enzymaktivitäten zwischen löslicher und Membran-Fraktion ist in Tab.9 wiedergegeben. Als Solubilisierungsgrad ist dabei die gelöste Enzymaktivität in Prozent der Gesamtaktivität angegeben.

Dabei zeigten sich zwischen den beiden Ölsamen neben Ähnlichkeiten auch deutliche Unterschiede. So ist die MDH bei Sonnenblumen weniger mit der Membran assoziiert als bei Raps. Umgekehrt ist die Lipase bei Sonnenblumen vollständig mit der Glyoxysomenmembran assoziiert, während bei Raps stets lipolytische Enzymaktivität in der Matrixfraktion nachweisbar war. Diese konnte selbst nach dreistündiger Zentrifugation bei 129 000 x g

nicht sedimentiert werden, was eine Verunreinigung der Glyoxysomalfraktion mit Lipase-haltigen Strukturen ausschließt, die unter diesen Zentrifugationsbedingungen pelletierbar sind (Theimer und Rosnitschek, 1978). Dagegen kann obiger Befund sowohl auf das Vorkommen eines Isoenzyms in der Matrix der Glyoxysomen als auch eines unspezifisch an die Glyoxysomenmembranaußenseite adsorbierten, cytoplasmatischen lipolytischen Enzyms zurückzuführen sein. Es erscheint jedoch naheliegender, daß diese lösliche Lipaseaktivität durch eine im Vergleich zur glyoxysomalen Lipase der Sonnenblumenkotyledonen schwächeren Membranbindung der glyoxysomalen Rapslipase bedingt ist (s.Abb.22).

Tab.9: Solubilisierungsgrad (SG) von Enzymen und Protein nach osmotischer Lyse der Glyoxysomen aus den Kotyledonen 3 Tage alter, etiolierter Raps- und Sonnenblumenkeimlinge.

Enzym	Sonnenblumen		Raps	
	SG (%)	Ausbeute(%)	SG (%)	Ausbeute (%)
LIP	8	6,5	20	67
Thiol	26	32	-	-
HAD	28	38	35	75
MS	16	67	20	79
MDH	61	78	24	80
ICL	77	78	96	98
CAT	48	70	60	75,5
Transam	114	120	-	-
CCR	93	96	-	-
Protein	62	93	51	78

Sowohl bei Raps als auch bei Sonnenblumen findet sich der überwiegende Teil des Markers für die β-Oxydation der Fettsäuren, HAD, in der glyoxysomalen Membranfraktion, ebenso wie MS, wohingegen ICL mehr oder weniger vollständig löslich erscheint. Erstaunlicherweise sedimentiert etwa die Hälfte der CAT bei beiden Spezies mit der Membranfraktion, was allerdings bei der leichten Bindung des Enzyms an Membranen (Biegelmayer et al., 1974) ein Artefakt sein könnte.

Zur Überprüfung der Methode wurde auch der Solubilisierungsgrad von Enzymaktivitäten der Glyoxysomen aus Ricinusendosperm überprüft (Tab.10). In Übereinstimmung mit Daten von Biegelmayer et al. (1973) und Huang und Beevers (1973) ergab sich eine vollständige Assoziation von MS mit den Membranen, während HAD und CAT nur zu etwa 40% sedimentierbar waren. ICL ist praktisch vollkommen löslich.

Tab.10: Solubilisierungsgrad (SG) von Enzymen nach osmotischer Lyse der Glyoxysomen aus dem Endosperm 5 Tage alter Ricinuskeimlinge.

Enzym	SG (%)	Ausbeute
MS	0	105
ICL	90	97,5
CAT	58	85
HAD	63	75

Um etwaiges artifizielles Anhaften der Enzymaktivitäten an Glyoxysomenmembranen auszuschließen, wurden Glyoxysomenghosts im Saccharosedichtegradienten 16 Stunden bei 61 000 x g (in der Beckmann Ultrazentrifuge, Rotor SW 27) bzw 30 Minuten bei 40 000 x g (in der Sorvall Hochgeschwindigkeitszentrifuge, Vertikalrotor SV 288) zentrifugiert. Abb.20 und 21 zeigen das für die Aktivitäten der alk. Lip, HAD, MS, ICL und CAT erhaltene Verteilungsprofil im Gradienten. Daraus sieht man, daß sich auch hierbei deutliche Unterschiede zwischen den Ölsamenspezies ergeben. Die Schwebedichte der Membranvesikel von Sonnenblumenglyoxysomen beträgt 1.165 kg/l, während die von Rapsglyoxysomen bei höheren Dichten sedimentierten (ca. 1.21 kg/l).

Abb.20: Verteilung der Aktivitäten glyoxysomaler Enzyme im linearen Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung einer osmotisch lysierten Glyoxysomalfraktion aus den Kotyledonen 3 Tage alter, etiolierter Rapskeimlinge. Die Gradienten wurden 16 Stunden bei einem durchschnittlichen Schwerefeld von 61 900 x g zentrifugiert.

1 Einheit entspricht:

LIP	0.05	ΔF/min x ml
MS	15,4	pkat/ml
HAD	53,4	pkat/ml
CAT	217	nkat/ml
ICL	34,1	pkat/ml

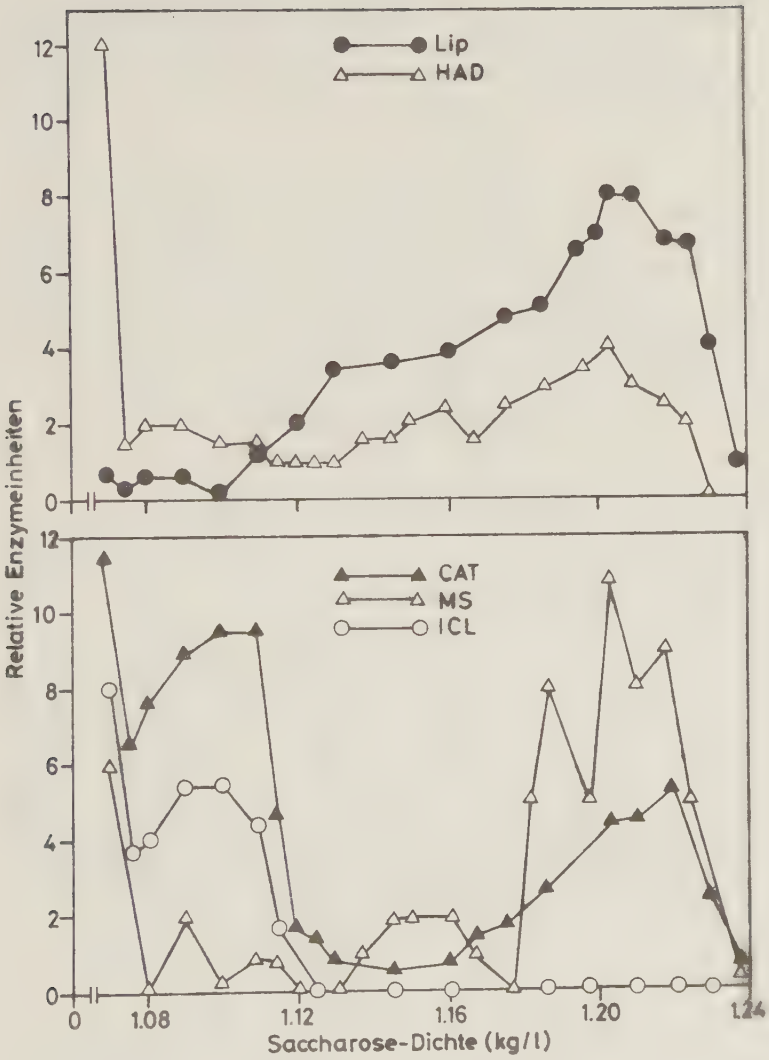
Lip
HAD
CAT
MS
ICL
Relative Enzymeinheiten
Saccharose-Dichte (kg/l)
0
2
4
6
8
10
12
1.08
1.12
1.16
1.20
1.24

Abb. 20

Abb.21: Verteilung der Aktivitäten glyoxysomaler Enzyme im linearen Saccharosedichtegradienten nach Fraktionierung einer osmotisch lysierten Glyoxysomalfraktion aus den Kotyledonen 3 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge.

a. der Gradient wurde in der Sorvall Hochgeschwindigkeitszentrifuge im Vertikalrotor SV 288 bei einem durchschnittlichen Schwerefeld von 40 000 x g 30 Minuten lang zentrifugiert, um hohe Verluste membranassoziierter Aktivität der Lip und HAD zu vermeiden (s.Tab.12).

b. der Gradient wurde in der Beckmann Ultrazentrifuge im Ausschwingrotor SW 27 bei einem durchschnittlichen Schwerefeld von 61 000 x g 16 h lang zentrifugiert.

1 Einheit entspricht:

LIP	0.048	ΔF/min x ml
HAD	133	pkat/ml
MS	140	pkat/ml
ICL	235	pkat/ml
CAT	769	nkat/ml

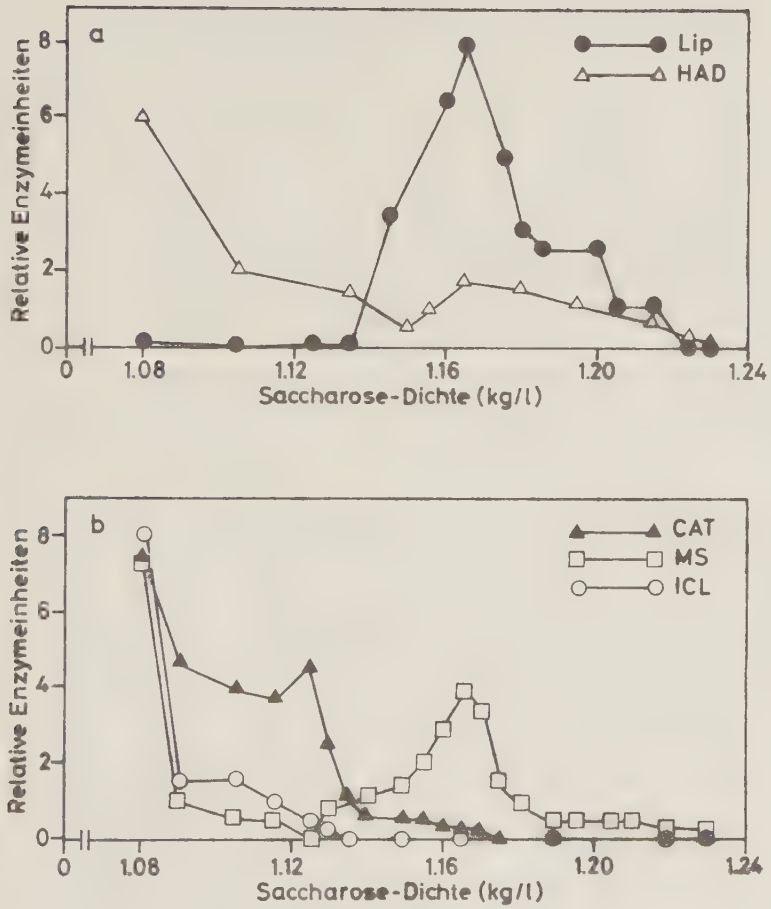
a
Lip
HAD
Relative Enzymeinheiten
0
2
4
6
8
0
1.08
1.12
1.16
1.20
1.24
Saccharose-Dichte (kg/l)
b
CAT
MS
ICL
Relative Enzymeinheiten
0
2
4
6
8
0
1.08
1.12
1.16
1.20
1.24
Saccharose-Dichte (kg/l)

Abb. 21

Beide enthalten praktisch die gesamte alk.Lipase-Aktivität der Glyoxysomalfraktion, jedoch keine ICL. In beiden Fällen findet sich nur ein Teil der HAD-Aktivität in dieser Fraktion, ein erheblicher Rest ist über alle Gradientenfraktionen verteilt, was darauf hindeutet, daß das Enzym beim Sedimentieren aus den Membranvesikel ausgewaschen wurde. Während in Sonnenblumenpräparaten ein signifikanter Teil der MS im Überstand des Dichtegradienten wiedergefunden wurde, enthielt dieser nach Zentrifugation glyoxysomaler Membranvesikel aus Raps nur mehr geringe MS-Aktivität. Andererseits weisen diese einen Teil der CAT-Aktivität auf, während Membranvesikel aus Sonnenblumenkotyledonen nahezu frei davon sind.

Ein weiteres Kriterium für die Lokalisierung einer Enzymaktivität mit einer Zellfraktion ist die Zunahme der spez. Enzymaktivität nach Isolierung dieser Fraktion. In Tab.11 ist daher die Anreicherung der vermutlich membranassoziierten Enzymaktivitäten zusammengestellt. Daraus ersieht man, daß die spezifischen Aktivitäten der MS gegenüber der Glyoxysomalfraktion in der Rohmembranfraktion ca. 2-fach höher sind. Entsprechendesgilt für die glyoxysomale MDH der Rapskotyledonen; dagegen ergibt sich für jene der Sonnenblumenkotyledonen bedingt durch den hohen SG (Tab.9) eine relativ geringfügige Anreicherung ihrer Aktivitäten nach Fraktionierung der Glyoxysomalfraktion, was auf eine nur schwach ausgeprägte Membranassoziierung schließen läßt. Nur bei Raps tritt eine deutliche Zunahme der spezifischen Aktivitäten der Lipase und des Markers der ß-Oxydation der Fettsäuren, HAD, in der Rohmembranfraktion auf. Die unerwarteterweise zunächst fehlende Anreicherung dieser Enzymaktivitäten bei Sonnenblumen läßt sich mit

den offenbar raschen Verlusten der Enzymaktivität nach osmotischer Lyse der Glyoxysomen erklären, die sich in den relativ niedrigen Ausbeuten niederschlagen (s.Tab.9).

Tab.11: Anreicherung membranassoziierter glyoxysomaler Enzymaktivitäten in der Rohmembranfraktion nach osmotischer Lyse der Glyoxysomalfraktion aus den Kotyledonen 3 Tage alter, etiolierter Raps- bzw. Sonnenblumenkeimlinge.

Enzym	Sonnenblumen Fraktion			Raps Fraktion		
	1	2	3	1	2	3
LIP	1	57	9,2	1	1,14	2,03
Thiol	1	49	9,8	-	-	-
HAD	1	66	16,5	1	15,9	23,7
MS	1	32	76	1	14,5	32
MDH	1	30	36,9	1	11,3	23,9

Fraktion:

1 Rohhomogenat
2 osmotisch lysierte Glyoxysomalfraktion
3 glyoxysomale Rohmembranfraktion

Eine genauere Untersuchung der Verhältnisse bei Sonnenblumenpräparaten ergab die in Tab.12 zusammengestellten Ergebnisse. So ergab Aufbewahrung der ge-

schockten Glyoxysomalfraktion über Nacht in Eis einen ca. 60%-igen Verlust an Aktivitäten der Lip und HAD. Diese Enzymaktivitäten sind aber in der isolierten glyoxysomalen Membranfraktion noch wesentlich labiler, da in diesen Präparaten nach 16 Stunden nur noch 9 bzw. 15% der Aktivität meßbar waren. Der Verlust in der Matrixfraktion dagegen war nur ca. 40%. Eine mögliche Ablösung von der Membran im Verlauf der Lagerung scheint also nicht der Grund für die Inaktivierung zu sein. Möglicherweise enthält die glyoxysomale Matrix einen Faktor, der für die Erhaltung der Enzymaktivitäten benötigt wird.

Tab.12: Aktivitätsverlust nach 16 stündiger Aufbewahrung bei 0°C in den Fraktionen nach osmotischer Lyse der Glyoxysomen aus 3 Tage alten, etiolierten Sonnenblumenkotyledonen.

Fraktion	Aktivität nach 16 Stunden als % der unmittelbar nach Organellfraktionierung bestimmten Aktivität			
	LIP	HAD	MS	CAT
osmotisch lysierte Glyoxysomalfraktion	41	52	63	76
Rohmembranfraktion	8,5	15	79,5	89
Matrixfraktion	-	63	72	66

Wurden folglich die Messungen der Aktivitäten, die üblicherweise einen Tag nach den Isolierungs- und Fraktionierungsschritten bestimmt wurden, unmittelbar daran anschließend durchgeführt, so konnte die Ausbeute der Aktivitäten der Lipase und der HAD auf 32% bzw. 59% erhöht werden. Für die Lipase konnte eine weitere Erhöhung der Ausbeute ihrer Aktivitäten auf 64% und einer damit verbundenen Anreicherung der spezifischen Aktivitäten in der Rohmembranfraktion um das 2-fache durch osmotische Lyse der Glyoxysomalfraktion in 0.1 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH9.0, dem zum Schutz von SH-Gruppen 4 mmol/l DTE hinzugegeben wurde, erzielt werden.

2. Versuche zur Festigkeit der Membranassoziation

Die dargelegten Daten geben auch erste Hinweise, daß zwischen membranassoziierten Enzymaktivitäten quantitative Unterschiede bezüglich der Festigkeit ihrer Bindung bestehen müssen. So ist etwa bei Sonnenblumen der Solubilisierungsgrad von Lip gleich null, während der der übrigen membranassoziierten Enzymaktivitäten ca. 20% beträgt. Durch Inkubation isolierter Glyoxysomalfraktionen aus den Kotyledonen drei Tage alter, etiolierter Raps-bzw. Sonnenblumenkeimlinge in Puffer, dem zur Erhöhung der Ionenstärke 0.2 mol/l KCl zugesetzt wurde, sollte die Art und Festigkeit der Assoziation mit der Glyoxysomenmembran überprüft werden. Wie Tab.13 zeigt, stört die hohe Salzkonzentration nicht die Aktivitäten der hier untersuchten Enzyme. Insbesondere bei Raps wird die HAD-Aktivität in Gegenwart von KCl sogar kräftig gesteigert. Ein Vergleich der Solubilisierung der Enzymaktivitäten von den Membranvesikeln von Glyoxysomen der beiden Ölsamen ist in Abb.22 wiedergegeben.

Tab.13: Einfluß von 0.2 mol/l KCl auf die Aktivitäten glyoxysomaler Membranenzyme.

Enzym	Enzymaktivität (100% = Aktivität ohne KCl)	
	Sonnenblume	Raps
LIP	83	74
MS	88	110
HAD	120	241
MDH	163	87

Daraus geht hervor, daß aus den Glyoxysomen beider Spezies durch Erhöhung der Ionenstärke MS, HAD und MDH verstärkt solubilisiert werden. Eine Ausnahme bildet nur die Lipase bei Sonnenblumen, die auch unter diesen Bedingungen membrangebunden bleibt, während beim Raps bis zu 40% der Enzymaktivität abgelöst werden können. Eine vollständige Freisetzung gelingt allerdings nur für die Aktivitäten von HAD und MDH, während bei beiden Spezies noch 20 - 30% der MS mit der Membranfraktion sedimentiert. Wie aus Abb.23 ersichtlich ist, erfolgt dabei die Ablösung letzteren Enzyms von der glyoxysomalen Membran aus Sonnenblumenkotyledonen sukzessiv durch Erhöhung der KCl-Konzentration im Puffer. Dagegen nimmt der Anteil des Proteins in der löslichen Fraktion der Glyoxysomen unter diesen Versuchsbedingungen nur mehr geringfügig gegenüber den Kontrollen ohne KCl zu, was darauf hindeutet, daß nur wenig ionisch gebundenes Protein nach dem osmotischem Schock mit den Membranen sedimentiert.

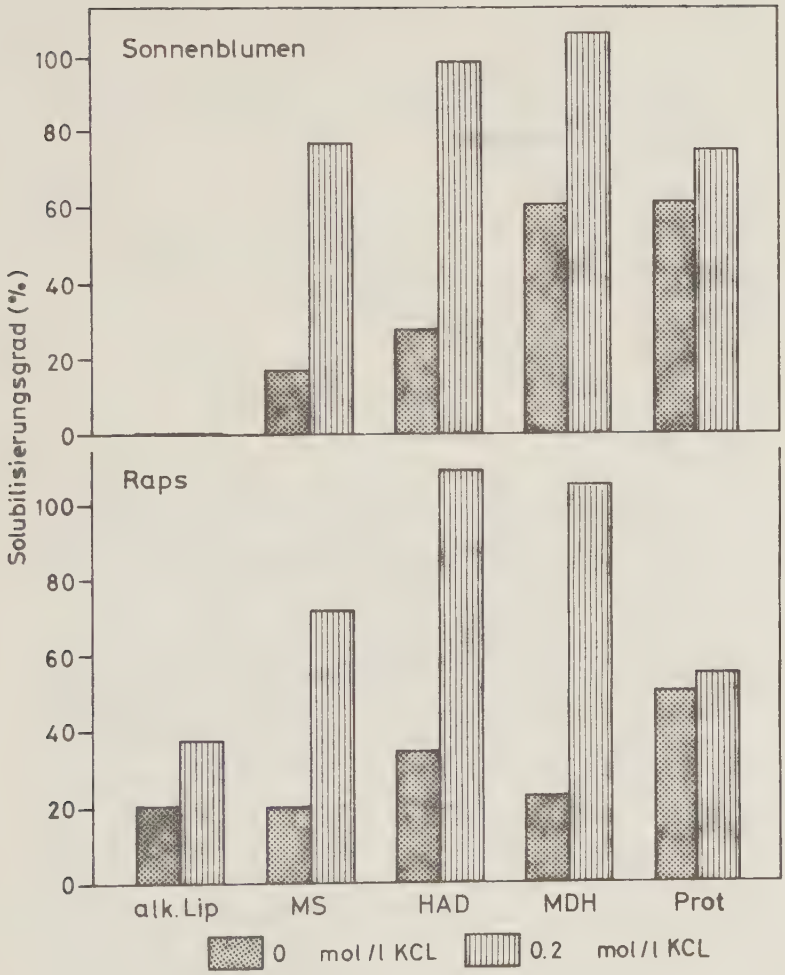

Abb.22: Solubilisierung membranassoziierter Enzyme der Glyoxysomen 3 Tage alter, etiolierter Raps- bzw. Sonnenblumenkeimlinge durch KCl.

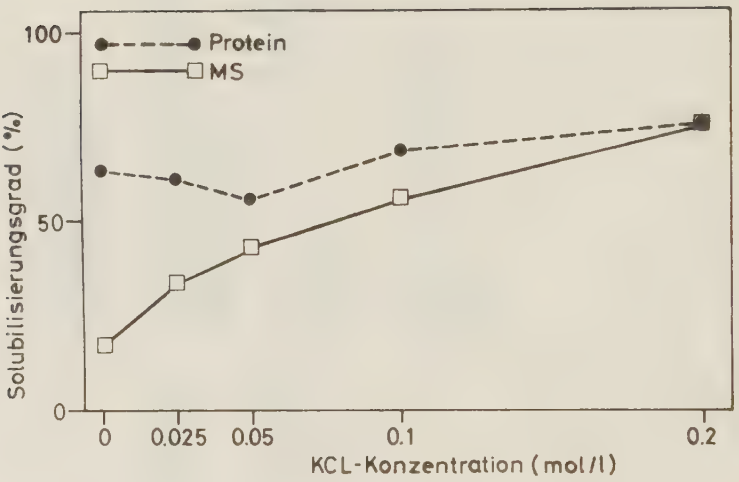

Abb.23: Einfluß der Erhöhung der Ionenstärke auf den Solubilisierungsgrad von MS und glyoxysomalen Protein nach osmotischer Lyse der Glyoxysomalfraktion aus den Kotyledonen 3 Tage alter, etiolierter Sonnenblumenkeimlinge.

D. Diskussion

Die ersten Schritte bei der Keimung von Ölsamen umfassen die Mobilisierung der Reservefette und ihren Umbau in Kohlenhydrate. Demgemäß treten als eine der ersten Enzymaktivitäten nach Imbibition der Samen lipolytische Enzymaktivitäten in den Fettspeichergeweben auf. Die vorgelegten Daten zeigen, daß sowohl in Kotyledonen von Brassica als auch von Helianthus mindestens zwei Lipasen auftreten , die unterschiedliche Substratselektivität aufweisen (Abb.2, 3; Tab.5). Eine Membranfraktion mit der Schwebedichte 1.11 - 1.15 kg/l trägt Enzymaktivitäten, die Fettsäuren aus Triacylglyceriden freizusetzen vermögen. Dagegen tritt in der Glyoxysomalfraktion eine Enzymaktivität auf, die nur Monoacylglyceridester spalten kann. Ähnliche Befunde wurden auch für andere Ölsamen erhoben (Huang und Moreau, 1978; Muto und Beevers, 1974), Allerdings ist die Verteilung der lipolytischen Enzymaktivität zwischen den beiden Zellstrukturen bei Raps und Sonnenblumen offenbar

nicht identisch. Bei Raps ist der größte Anteil der Lipaseaktivität in einer Membranfraktion lokalisiert und nur wenig Aktivität mit der Glyoxysomalfraktion assoziiert. Dagegen liegen bei Sonnenblumen umgekehrte Verhältnisse vor.

Dies kann aber möglicherweise durch einen Lipase-inhibitor vorgetäuscht werden (Rosnitschek, 1977). Dieser könnte spezifisch die Triacylglyceridester spaltende Lipase der Membranfraktion hemmen, die dadurch eine im Vergleich zum Triglyceridabbau in vivo (ca. 100 pkat/KP, s.Gerhardt, 1973) deutlich geringere in vitro Aktivität mit Tri- bzw. Monoglyceriden als Substrat aufweist (ca.4 bzw. 37 pkat/KP, s.Tab.5). Die in vitro Aktivitäten der glyoxysomalen Lipase mit Monopalmitin als Substrat (bis zu 170 pkat/KP, s.Tab.5) sind dagegen ausreichend um die im intakten Gewebe zu beobachtende Hydrolyse der Monoglyceride zu erklären. Entsprechendes gilt für die mikrosomale und glyoxysomale Raps-Lipase. Wie Berechnungen basierend auf den Werten in Tab.5 ergeben, weisen diese beiden Enzyme deutlich höhere in vitro Aktivitäten mit Sonnenblumenöl bzw. Monopalmitin als Substrat auf als gemäß dem Verschwinden des Reservefetts aus dem Gewebe notwendig wäre (2.4 pkat/KP, s.Rosnitschek und Theimer, 1980).

Im Gegensatz zum Ricinusendosperm (Marriott und Northcote, 1975; Muto und Beevers, 1974) entfalten sowohl beim Raps als auch bei Sonnenblumen beide Lipase-Typen im Alkalischen optimale Aktivität (Abb.5). Auch besitzen die beiden in den Rapskotyledonen auftretenden Lipasen den selben K_M-Wert für MIM als Substrat (Abb.8).

Die hier untersuchten glyoxysomalen Lipasen weisen insgesamt Eigenschaften auf, welche denen der bislang einzigen, näher charakterisierten glyoxysomalen Lipase des Ricinusendosperms (Muto und Beevers, 1974) ähneln: neben der Unfähigkeit, Triglyceride spalten zu können, besitzen sie mit jener nahezu identische K_M-Werte für MIM als Substrat, weisen ein deutlich ausgeprägtes Aktivitätsoptimum bei pH-Werten von 8.5 - 9.0 auf und werden durch das Detergenz Triton X-100 und das SH-Gruppengift PCMBS bereits in geringen Konzentrationen stark gehemmt (Tab.6). Sie unterscheiden sich aber deutlich dadurch, daß sie von Ca^{2+} nicht beeinträchtigt werden, während die glyoxysomale Lipase des Ricinusendosperms durch 1 mmol/l Ca^{2+}um ca. 80% gehemmt wird.

Auch die Triacylglyceridester spaltende Lipase der Rapskotyledonen wird weder durch Ca^{2+} noch Na^{+} im Testmedium beeinflußt, ein Befund, der im deutlichen Gegensatz steht zu Resultaten von Rosnitschek und Theimer (1980); denn bei der Messung mit dem titrimetrischen Enzymtest mit Sonnenblumenöl als Substrat ergab sich eine deutliche Aktivitätssteigerung durch Zugabe dieser Ionen. Offenbar beruht deren positiver Effekt nicht auf einer Beeinflussung des Enzymproteins selbst, sondern geht möglicherweise auf eine Erniedrigung des apparenten pK-Wertes der an der Substratoberfläche akkumulierenden Fettsäuren zurück, was sich im titrimetrischen Test besonders auswirkt (Brockerhoff und Jensen, 1974). EDTA dagegen ist unabhängig von der verwendeten Testmethode ein starker Inhibitor für die Triacylglyceridester spaltende Lipase, die sich hierin deutlich von der glyoxysomalen unterscheidet.

Sowohl die mikrosomale als auch die glyoxysomale Lipase zeigen eine deutlich ausgeprägte Produkthemmung durch freie, langkettige Fettsäuren (Abb.7). Erucasäure, die im Öl der für diese Untersuchungen verwendeten Rapssorte eine wesentliche Fettsäurekomponente darstellt, hemmt gegenüber den anderen untersuchten Fettsäuren die glyoxysomale Lipase am stärksten. Ein ähnlicher Effekt war auch für die Triacylglyceridester spaltende Lipase des Raps im titrimetrischen Testsystem festgestellt worden (Rosnitschek und Theimer, 1980).

Diese Befunde deuten auf eine Feinregulation der Lipolyse durch Rückkopplungshemmung beider Lipasen hin, wenn der Stoffwechsel der freigesetzten Fettsäuren limitierend wird und diese am Ort ihrer Entstehung akkumulieren (Patton und Carey, 1979; Scow et al., 1979; Rosnitschek und Theimer, 1980). Jedoch kann anhand der in dieser Arbeit erbrachten Befunde keine Aussage über die Interaktion beider Lipasen, sowie deren Regulation im Verlauf der frühen Keimlingsentwicklung getroffen werden.

Die Entwicklung der Lipaseaktivität verläuft offenbar in den beiden untersuchten Ölsamen nicht gleich ab: So findet man in ruhenden oder frisch imbibierten Rapssamen keine alkalische Lipaseaktivität, was die Befunde von Theimer und Rosnitschek (1978) bestätigt. Sie ist aber in ruhenden Helianthussamen ebenso wie in reifenden bereits nachweisbar (Tab.8). Da ein geringer Teil der Lipaseaktivität mit der Glyoxysomalfraktion reifender Sonnenblumensamen sedimentiert (Abb.10 und 12), dürften diese zumindest eine glyoxysomale Monoglyceridlipase besitzen. Ob daneben eine Triacylglyceridester spaltende Lipase im Homogenat in aktiver Form vorhanden ist, kann anhand

der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Durch deren Fehlen, wie dies für ruhende Rapssamen gezeigt werden konnte (Theimer und Rosnitschek, 1978) könnte jedoch die während der Samenreifung produzierte, hinsichtlich ihrer Enzymausstattung funktionsfähige Glyoxysomenpopulation (Abb.12, 13) während der Embryogenese inaktiv gehalten werden. Dies wäre ein alternativer Regulationsmechanismus zu dem offensichtlich in den Embryonen reifender Baumwollsamen evolvierten (Choinski und Trelease, 1978; Ihle und Dure, 1972; Miernyk et al., 1979), wo m-RNS der ICL zwar gebildet, nicht aber translatiert wird, die Microbodies folglich durch einen unvollständigen glyoxysomalen Enzymsatz inaktiv gehalten werden. Andererseits kann das Fehlen von ICL-Aktivität auf deren Maskierung durch einen ICL-Inhibitor zurückzuführen sein, dessen Hemmwirkung in den Embryonen von Baumwollsamen erst nach Imbibition aufgehoben wird, während dieser Vorgang bei Sonnenblumen bereits gegen Ende der Embryogenese einsetzt.

Ähnlich den Befunden an Embryonen reifender Gurken- und Baumwollsamen (Choinski und Trelease, 1978; Köller et al., 1979), erfolgt im Verlauf der Embryogenese von Helianthussamen die Synthese bzw. Aktivierung glyoxysomaler Enzyme offenbar nicht synchron, sondern konsekutiv in der Reihenfolge CAT - HAD - MS - ICL. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann jedoch nicht entschieden werden, ob gegen Ende der Samenreifung ICL-haltige Glyoxysomen neu produziert werden, ICL innerhalb der bereits vorhandenen Microbodies aktiviert oder nach Synthese im Cytosol in diese eingeschleust wird, wie dies kürzlich für Neurospora gezeigt werden konnte (Zimmermann und Neupert, 1980). Hinweise für letzteren Mechanismus sind auch das primäre Auftreten

von ICL-Aktivität ausschließlich in der löslichen Fraktion des Gradienten (Abb.10) und die nachfolgende Kompartimentierung mit der Glyoxysomalfraktion (Abb.12), deren Schwebedichte damit korrespondierend zunimmt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, daß neuproduzierte, ICL-haltige glyoxysomale Strukturen besonders fragil sind, die ICL folglich leicht ausgewaschen wird.

Die Bildung glyoxysomaler Enzymaktivitäten in den Kotyledonen, die durch die Samenruhe unterbrochen wird, setzt ca. 24 h nach Imbibition der Helianthussamen erneut drastisch ein (Abb.14).
Ähnlich den Befunden am Maisscutellum (Longo und Longo, 1975) und Weizenkeimling (Doig und Laidman, 1975), verläuft während der folgenden Phase des Keimlingwachstums von Sonnenblumen die Entwicklung der Enzyme der β-Oxydation der Fettsäuren und des Glyoxylsäurezyclus nicht synchron (Abb.14,16). So erreichen Thiol und HAD, Schlüsselenzyme der β-Oxydation der Fettsäuren 1-2 Tage früher ihr Aktivitätsmaximum als die Schlüsselenzyme des Glyoxylsäurezyclus, ICL und MS,und CAT. Während die HPR, deren physiologische Rolle in den Kotyledonen etiolierter Keimlinge bislang noch nicht geklärt ist (Schnarrenberger et al., 1971), eine von beiden Enzymgruppen klar abweichenden Aktivitätsverlauf zeigt, besteht eine deutliche Parallelität der Entwicklung glyoxysomaler Lipaseaktivität (Abb.16) und der ihr metabolisch nahestehenden Enzymaktivitäten der β-Oxydation der Fettsäuren. Aufgrund dieses Entwicklungsmusters glyoxysomaler Enzymaktivitäten läßt sich eine Aufgliederung in 3 Enzymgruppen erstellen - glyoxysomale Lipase und β-Oxydation der

Fettsäuren, CAT und Enzyme des Glyoxylsäurezyclus und Enzyme des Glycolatstoffwechsels - die im Verlauf der heterotrophen Phase der Keimlingsentwicklung von Helianthus offenbar verschieden reguliert werden.

Aufgrund der Korrelation der Entwicklung Acetyl-CoA-Einheiten liefernder und verwertender Enzymaktivitäten (ß-Oxydation der Fettsäuren bzw. Glyoxylsäurezyclus) stellt dieser Stoffwechselmetabolit möglicherweise einen Regulationsfaktor dar, der als positiver Effektor auf die Enzymaktivitäten des Glyoxylsäurezyclus wirkt. Diese Annahme wird unterstützt durch neuere Befunde von Kudielka (1980), der in Zellsuspensionskulturen von Pimpinella anisum eine Dereprimierung der Aktivitäten von MS und ICL durch Acetat zeigen konnte.

Aus dem asynchronen Entwicklungsmuster glyoxysomaler Enzymaktivitäten kann geschlossen werden, daß während der heterotrophen Phase der Keimlingsentwicklung entweder Glyoxysomen mit kontinuierlich wechselnder Enzymausstattung auftreten oder die Ausstattung bestehender Organellen laufend verändert wird. Ob die im elektronenmikroskopischen Bild beobachtete Pleomorphie der Glyoxysomen (Wanner, 1977) damit in Zusammenhang steht, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Dabei lassen sich die Glyoxysomen in sukzessiv auftretende Populationen einteilen, die für jeweils ein Entwicklungsstadium des Sämlings typisch sind (Abb.24). Während der ersten Phase der Keimlingsentwicklung (ca. 24 h), in der der Sämling mit der Keim-

wurzel nach dem Quellungsvorgang die Samenschale durchbricht, liegt eine im Verlauf der Embryogenese gebildete Glyoxysomenpopulation A vor, die diesem für die anlaufenden Metabolisierungsvorgänge zur Verfügung steht.

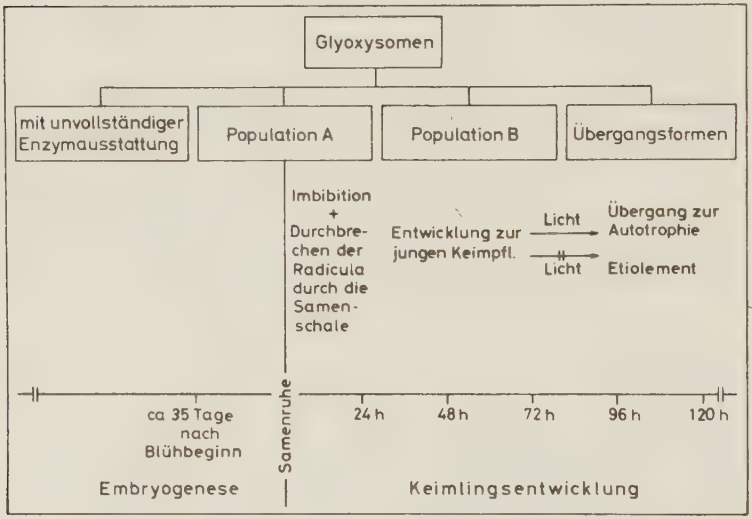

Abb.24: Schematische Darstellung der Korrelation von Glyoxysomenpopulationen mit Enwicklungsstadien des Sämlings.

In den folgenden 2 Tagen, in die die Hauptphase des Fettabbaus fällt (Gerhardt, 1973) tritt eine Glyoxysomenpopulation B auf, welche die hierfür notwendigen Enzymaktivitäten der Lip und der β-Oxydation der Fettsäuren in hohem Maße enthält, während

die Aktivitäten des Glyoxylsäurezyclus und der CAT submaximal sind und die Aktivität der HPR, eines Schlüsselenzyms des Glycolatstoffwechsels, noch nicht nachweisbar ist. Diese tritt erstmal zu einem Zeitpunkt auf, wo der Embryo sich zu einer jungen Keimpflanze entwickelt hat (ca. 3-4 Tage nach Imbibition der Samen) und demnach bei Belichtung zum Übergang in die autotrophe Lebensweise befähigt wäre. Die hierfür notwendige Transformation der Microbodies von glyoxysomaler Funktion zu blattperoxisomaler wird dabei offensichtlich unabhängig von Licht durch endogene Steuersignale mit der Umstrukturierung der Glyoxysomenpopulation B in Glyoxy-Peroxisomen eingeleitet. Kontrollfaktoren hierzu könnten etwa Cytokinine sein (Theimer et al., 1976), während Licht eine Steigerung der Bildung blattperoxisomaler Enzymaktivitäten induziert.

Ein vergleichbarer Entwicklungsmodus scheint in den Kotyledonen von Rapskeimlingen vorzuliegen, da mit Ausnahme der Thiol die glyoxysomalen Enzymaktivitäten ein ähnliches Entwicklungsmuster wie bei Helianthus zeigen (Abb.15). Da die Thiol zusätzlich eine wesentliche Rolle als ein Schlüsselenzym der Terpenoidsynthese spielt (Middleton, 1973), könnte der von der HAD abweichende Verlauf der Aktivitätsentwicklung auf das Auftreten von Isoenzymen zurückzuführen sein. Dagegen kann die NADH-spezifische HAD bei Messungen im Rohhomogenat als glyoxysomaler Marker angesehen werden, da sie, soweit bekannt (Kindl und Wöber, 1975) in Eukaryontenzellen nur in der β-Oxydation der Fettsäuren fungiert, die nach Befunden mit Kotyledonen von Sonnenblumen (Abb.17,19) und Gurke (Frevert et al., 1980), sowie beim Ricinusendosperm (Cooper und Beevers, 1969) ausschließlich in den Glyoxysomen lokalisiert sein sollte.

Zwei Modellvorstellungen können die Modifikation der Enzymausstattung der Glyoxysomen erklären:

1. Die Glyoxysomen als Ganzes unterliegen einem schnellen, kontinuierlichen Umsatz (Schopfer et al., 1976). Der dabei für die Aktivitäten der alk. Lipase, Thiol und HAD auftretende Verlust der Pelletierbarkeit mit der Glyoxysomalfraktion und die damit einhergehende Zunahme in den löslichen Fraktionen des Gradienten nach 3 Tagen Keimung (Abb.17,18) kann in diesem Sinne dahingehend interpretiert werden, daß die Enzyme aus den zerfallenden Glyoxysomen schneller freigesetzt werden als sie in der Zelle abgebaut werden können. Allerdings sind während dieser frühen Keimungsperiode bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen bisher nie Abbaustadien von Glyoxysomen gefunden worden (Wanner, 1977), wie dies aufgrund des geforderten hohen Umsatzes der Organellen zu erwarten wäre.

2. Die glyoxysomalen Enzyme werden im Cytosol synthetisiert und nachfolgend in die Glyoxysomen eingebaut (Köller und Kindl, 1980; Kindl et al., 1980; Zimmermann und Neupert, 1980), die während der Änderung der Enzymausstattung in ihrer strukturellen Organisation erhalten bleiben. Andererseits könnten nicht mehr benötigte Enzyme in den Glyoxysomen inaktiviert (Theimer, 1976; Khan et al., 1979; Schmid-Neuhaus, 1978) oder aus denselben ausgeschleust werden. Für die Enzyme der β-Oxydation der Fettsäuren und der Lipase wäre demnach ein erhöhter Export aus den Glyoxysomen nach 3 Tagen Keimung zu fordern, wobei die Enzyme im Cytosol jedoch ihre Aktivität beibehalten müßten.

Andererseits wäre eine Umstrukturierung der glyoxysomalen Membran bzw. eine Modifizierung der Enzymproteine denkbar, derzufolge diese nicht mehr in das Organell inkorporiert werden können, während die kompartimentierten Enzyme weiterhin mit unveränderter Rate inaktiviert und/oder abgebaut werden. Hinsichtlich beider Modellvorstellungen wäre demnach für die Lipase und Enzyme der ß-Oxydation die Abnahme der Gesamtaktivität, bedingt durch eine reduzierte Syntheserate oder das Auftreten spezifischer Inaktivatoren niedriger als die der partikulären Aktivitäten (Abb.14, 16).

Da die alkalische Lipase und die Enzyme der ß-Oxydation der Fettsäuren integral bzw. peripher mit der glyoxysomalen Membran assoziiert sind (s.Kap.IV), kann vorgenannter Befund als ein spezifischer Regulationsmechanismus angesehen werden, mittels dem die Transformation des glyoxysomalen Microbodytyps in den blattperoxisomalen ohne Zerstörung des Organells erfolgen kann. Die Umstrukturierung der Membran erfolgt jedoch offensichtlich sukzessive, da die Entwicklung der MS-Aktivität als ein weiteres peripheres Membranenzym (Kap.IV) mit ausschließlich glyoxysomaler Funktion sich deutlich von der der alkalischen Lipase und den Enzymen der ß-Oxydation der Fettsäuren unterscheidet. Die in einigen Versuchen beobachtete Zunahme des Solubilisierungsgrades der MS-Aktivität in den Glyoxysomen älterer etiolierter Sonnenblumenkotyledonen nach osmotischer Lyse könnte dabei in einem kausalen Zusammenhang mit einer diesbezüglichen Modifizierung der Glyoxysomenmembran stehen, wodurch die Membranbindung der MS lockerer wird bzw. das neusynthetisierte und inkorporierte Enzymprotein nicht bzw. schwächer an die Membran gebunden wird.

E. Zusammenfassung

1. Im Verlauf früher Stadien der Keimlingsentwicklung von Raps und Sonnenblumen treten in den fettspeichernden Kotyledonen zwei Lipasen mit gleichem Aktivitätsoptimum im Alkalischen bei pH 8.5 - 9.0, jedoch unterschiedlicher Substratselektivität auf:
eine Tri- und Monoacylglyceridester spaltende Lipase, die im Saccharosedichtegradienten mit einer Membranfraktion der Schwebedichte von 1.11 - 1.15 kg/l sedimentiert, und eine fest mit der Glyoxysomenmembran assoziierte, nur Monoacylglyceridester spaltende Lipase.

   Die beiden Lipasen der Rapskotyledonen besitzen denselben K_M-Wert für N-Methylindoxylmyristat als Substrat im fluorimetrischen Test und zeigen eine deutlich ausgeprägte Produkthemmung durch freie langkettige Fettsäuren. Erucasäure, die im Öl der für diese Untersuchungen verwendeten Rapssorte eine wesentliche Fettsäurekomponente darstellt, hemmt gegenüber den anderen untersuchten Fettsäuren die glyoxysomale Lipase am stärksten, was auf eine Feinregulation der Lipolyse durch Rückkopplungshemmung schließen läßt.

Die glyoxysomale Lipase von Raps- und Sonnenblumenkotyledonen spaltet bevorzugt p-Nitrophenylester langkettiger Fettsäuren, benötigt weder Mono- noch Bivalente Metallionen als Cofaktoren im Testansatz und wird durch Detergentien und SH-Gruppengifte bereits in geringen Konzentrationen stark gehemmt.

2. Während in ruhenden Rapssamen keine alkalische Lipaseaktivität nachweisbar ist, tritt diese bereits in den Embryonen reifender und ruhender Helianthussamen auf. Nach einer lag-Phase von 24 h nach Keimbeginn steigt die Lipaseaktivität in den Sonnenblumenkotyledonen während der Keimung im Dunkeln bis zum dritten Tag kräftig an, um in den folgenden vier Tagen wieder aus dem Gewebe zu verschwinden; damit folgt der Verlauf der Entwicklung der Lipaseaktivität dem der glyoxysomalen Enzymaktivitäten.

3. Zu Beginn der Keimung liegt in den Sonnenblumenkotyledonen bereits eine Glyoxysomenpopulation vor (Schwebedichte 1.23 kg/l), die Aktivitäten von alkalischer Lipase, 3-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase, Katalase, Malatsynthetase und Isocitratlyase aufweist. Die Bildung dieser offensichtlich funktionsfähigen Organellen erfolgt durch sukzessive Vervollständigung der glyoxysomalen Enzymausstattung im Verlauf der Reifung von Helianthussamen.

4. Die Entwicklung charakteristischer glyoxysomaler Enzymaktivitäten in Sonnenblumenkotyledonen verläuft während der Keimung im Dunkeln so, daß drei Gruppen von jeweils metabolisch kooperierenden Enzymen - 3-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase und β-Ketothiolase (Leitenzyme der β-Oxydation der

Fettsäuren) sowie glyoxysomale Lipase -, Malatsynthetase und Isocitratlyase (Schlüsselenzyme des Glyoxylsäurezyclus) sowie Katalase - und Hydroxypyruvat-Reduktase (Leitenzym der Blattperoxisomen) - nacheinander jeweils ihr Aktivitätsmaximum erreichen.

5. Als Folge des asynchronen Entwicklungsmusters glyoxysomaler Enzymaktivitäten zeigen die Glyoxysomalfraktionen im Verlauf der Dunkelkeimung von Helianthussamen eine schrittweise Veränderung der Enzymausstattung.

6. Neben der Änderung der Enzymaktivitäten im Verlauf der Keimung von Helianthussamen weist auch ihre Assoziation mit der Glyoxysomalfraktion charakteristische Unterschiede auf. Der Prozentsatz an Glyoxysomen gebundener Aktivitäten von 3-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase und ß-Ketothiolase nimmt bis Tag 3 zu und danach wieder drastisch ab, während der Anteil von Isocitratlyase, Malatsynthetase und Katalase in der Glyoxysomalfraktion nach Erreichen der maximalen Sedimentierbarkeit am 3.Keimungstag über weitere 3 Tage nahezu konstant bleibt.

7. Die wechselnde Assoziierung der Aktivitäten glyoxysomaler Enzymsysteme mit den Glyoxysomen im Verlauf der Keimung ist nicht korreliert mit einer unterschiedlichen intrapartikulären Lokalisation. Während Isocitratlyase und Katalase Enzyme der Glyoxysomenmatrix sind, liegen Malatsynthetase, Malatdehydrogenase sowie Lipase, 3-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase und ß-Ketothiolase membranassoziiert vor.

7. Die Festigkeit der Membranassoziation einzelner glyoxysomaler Enzyme weist quantitative Unterschiede auf. Durch Erhöhung der Ionenstärke (0.2 mol/l KCl)

werden die Aktivitäten der 3-Hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase, Malatsynthetase und Malatdehydrogenase nahezu vollständig von der Membran abgelöst; die Aktivitäten der glyoxysomalen Lipase von Sonnenblumen- bzw. Rapskotyledonen bleiben dagegen vollständig bzw. zu 60% mit der Membran assoziiert. An der Bindung dieses Enzyms sind demnach offenbar nicht ionische Wechselwirkungen beteiligt.

9. Die Daten werden dahingehend interpretiert, daß die Transformation des glyoxysomalen Microbodytyps in den blattperoxisomalen schon im Dunkeln mit der Bildung von Übergangsformen eingeleitet wird. Dieser Vorgang erfolgt möglicherweise durch sukzessive Veränderung der Enzymausstattung der glyoxysomalen Matrix sowie der Membran.

F. Literaturverzeichnis

Akhtar, M.W., und N.Kausar (1978). A study on garma (cucumis melo) seed lipase. Pak.J.Biochem. 11, 6-11.

Baker, A.L. und N.E.Tolbert (1966). Glycolate oxidase (ferredoxin containing form). In: Methods in Enzymologie, Vol.IV, 338-342. Eds.:Colowick, S.P. und N.O.Kaplan, London-New York: Academic Press.

Beevers, H. (1969). Glyoxysomes of castor bean endosperm and their relation to gluconeogenesis. Annals of the N.Y.Acad. of Sciences 168, 313-324.

Beevers, H. (1979). Microbodies in higher plants. Ann.Rev.Plant Physiol. 30, 159-193.

Beevers, H., R.R.Theimer und J.Feierabend (1974). Microbodies (Glyoxysoman, Peroxisomen). In: "Biochemische Cytologie der Pflanzenzelle" (Hrsg.G.Jacobi) p.127, Thieme Verlag Stuttgart.

Biegelmayer, C., J.Graf und H.Ruis (1974). Membranes of glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzymes bound to purified membrane preparations. Eur.J.Biochem.37, 553-562.

Biegelmayer, C., G.Nahler und H.Ruis (1974). Membranen von Glyoxysomen aus Rizinus -Endosperm. Weitere Untersuchungen über die membrangebundenen Enzyme des Fettsäureabbaus und des Glyoxylatzyklus. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.355, 1121-1128.

Blobel, G. und B.Dobberstein (1975). Transfer of protein across membranes. Presence of proteolytically processed and nonprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane -bound ribosomes of murine myeloma. J.Cell Biol.67, 835-851.

Breidenbach, R.W. und H.Beevers (1967). Association of the glyoxylate cycle enzymes in a novel subcellular particle from castor bean endosperm. Biochem.Biophys.Res.Commun.27, 462-469.

Brockerhoff, H. und R.G.Jensen (1974). Lipolytic Enzymes. Academic Press New York.

Brown, R.H., J.M.Lord und M.J.Merrett (1974). Fractionation of the proteins of plant microbodies. Biochem.J.144, 559-566.

Choinski, J.S. und R.N.Trelease (1978). Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. II.Glyoxysomal enzyme development in embryos. Plant Physiol.62, 141-145.

Cooper, T.G. und H.Beevers (1969). β-Oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. J.Biol.Chem.244, 3514-3520.

Cooper, T.G., (1971). The activation of fatty acids in castor bean endosperm. J.Biol. Chem. 246, 3451-3455.

Desnuelle, P. und P.Savary (1963). Specifities of Lipase. J.Lipid Res.4, 369-384.

Dixon, G.H. und H.S.Kornberg (1959). Assay methods for the enzymes of the glyoxylate cycle. Biochem.J.72, 3.

Doig, R.I., A.J.Colborne, G.Morris und D.L.Laidman (1975). The induction of glyoxysomal enzyme activities in the aleurone cells of germinating wheat. J.Exp.Bot.26, 387-398.

Duncombe, W.G., (1959). The colorimetric determination of the longchain fatty acids in the 0.05-0.5 µmole range. Biochem.J.83, 6.

Dundas, D.G.A., H.M.Henderson und N.A.M.Eskin (1978). Lipase from Vicia faba minor.Fd.Chem.3, 171-178.

Frederick, S.E., P.Gruber und E.H.Newcomb (1975). Plant Microbodies (Review Article). Protoplasma 84, 1-29.

Frevert, J. und H.Kindl (1980). A bifunctional enzyme from glyoxysomes purification of a protein possessing enoyl -CoA hydratase and 3-hydroxyacyl -CoA dehydrogenase activities. Eur.J.Biochem.107, 79-86.

Frevert, J. und H.Kindl (1977). Glyoxysomal matrix enzymes. Hoppe-Seyler's Physiol.Chem.358, 1202.

Galliard, T., (1971). Enzymic deacylation of lipids in plants. The effect of free fatty acids on the hydrolysis of phospholipids by the lipolytic acyl hydrolase of potato tubers. Eur.J.Biochem.21, 90-98.

Galliard, T., (1974). Techniques for overcoming problems of lipolytic enzymes and lipoxygenases in the preparation of plant organelles. In: "Methods in enzymologie XXXI". (ed.S.Fletcher and L.Packer). 520-528. Academic Press, New York.

Gerhardt, B. und T.Betsche (1976). The Change of microbodies from glyoxysomal to peroxisomal function within fatty, greening cotyledons: hypotheses, results, problems. Ber.dtsch.bot.Ges.89, 321-334.

Gerhardt, B. und T.Betsche (1978). Apparent catalase synthesis in sunflower cotyledons during the change in microbody function. Plant Physiol.62, 590-597.

Gerhardt, B. (1973). Untersuchungen zur Funktionsänderung der Microbodies in Keimblättern von Helianthus annuus L.Planta 110, 15-28.

Gerhardt, B. und H.Beevers (1970). Development studies on glyoxysomes in ricinus endosperm. J.Cell Biol.44, 94-102.

Gerhardt, B. (1978). Microbodies/Peroxisomen pflanzlicher Zellen. Cell Biology Monographs Volume 5. Wien:Springer.

Gientka-Rychter, A. und J.H.Cherry (1968). De novo syntheses of isocitratase in peanut cotyledons. Plant Physiol.43, 653-59.

Gonzalez, E. und H.Beevers (1976). Role of the endoplasmatic reticulum in glyoxysome formation in castor bean endosperm. Plant Physiol.57, 406-409.

Guibault, G.G. und J.Hieserman (1969). Fluorimetric substrate for sulfatase and lipase. Anal.Chem.41, 2006-2009.

Hasson, E.P. und C.G.Laties (1976). Separation and characterization of potato lipid acylhydrolases. Plant Physiol.57, 142-147.

Hayase, K. und A.L.Tappel (1970). Specifity and other properties of lysosomal lipase of rat liver. J.Biol.Chem.245, 169-175.

Hock, B. und H.Beevers (1966). Development and decline of the glyoxylate cycle enzymes in watermelone seedlings (Citrullus vulgaris Schrad.). Effects of dactinomycin and cycloheximide. Z.Pflanzenphysiol.55, 405-414.

Huang, A.H. und H.Beevers (1973). Localization of enzymes within microbodies. J.Cell Biol.58, 379-389.

Huang, A.H., (1975). Comparative studies of glyoxysomes from various fatty seedlings. Plant Physiol.55, 870-874.

Huang, A.H. und R.Moreau (1978). Lipases in the storage tissues of peanut and oil seeds during germination. Planta 141, 111-116.

Hutton, D. und P.K.Stumpf (1969). Fat metabolism in higher plants. Characterization of the β-Oxidation systems from maturing and germinating castor bean seeds. Plant Physiol.44, 508-516.

Ihle, J.N. und L.S.Dure (1972). The development biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination.III.Regulation of the biosynthesis of enzymes utilizes in germination. J.biol.Chem.247, 5048-5055.

Jacks, T.J., Yatsu, L.Y. und A.M.Altschul (1967). Isolation and characterization of peanut spherosomes. Plant Physiol.42, 585-590.

Kagawa, T., D.J.Mc Gregor und H.Beevers (1973). Development of enzymes in the cotyledons of watermelons seedlings. Plant Physiol. 51, 66-71.

Kawamoto, S. und S.Fukui (1978). Fatty acid β-oxidation system in microbodies of n-alkane -grown Candida tropicalis. Eur.J.Biochem.83, 609-613.

Khan, F.R., M.Saleemuddin, M.Siddiqi und B.A.Mc Fadden (1979). The appearance and decline of isocitrate lyase in flax seedlings. J.Biol.Chem.254, 6938-6945.

Kindl, H. und G.Majunke (1973). Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung von Mikrokörpern in Keimblättern von Lens culinaris. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 987-998.

Kindl, H., W.Köller und J.Frevert (1980). Cytosolic precursor pools during glyoxysome biosynthesis. Hoppe Seyler's Z.Physiol. Chem.361, 465-467.

Kindl, H. und G.Wöber (1975). Biochemie der Pflanzen. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York.

Köller, W. und H.Kindl (1980). 19 S cytosolic malate synthase. A small pool characterized by rapid turnover. Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.361, 1437-1444.

Köller, W., J.Frevert und H.Kindl (1979 a). Incomplete glyoxysomes appearing at a late stage of maturation of cucumber seeds. Z.Naturforsch.34 c, 1223-1236.

Köller. W., J.Frevert und H.Kindl (1979 b). Albumins, glyoxysomal enzymes and globulins in dry seeds of cucumis sativus: qualitative and quantitative analysis. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.360, 167-176.

Köller, W. und H.Kindl (1977). Glyoxylate cycle enzymes of the glyoxysomal membrane from cucumber cotyledons. Arch.Biochem.Biophys.181, 236-248.

Kudielka, R., (1980). Untersuchungen zur Regulation der Microbodies eukaryontischer Pflanzenzellen durch Substrate und Licht. Dissertation, Botanisches Institut München.

Lazarow, P., (1978). Rat liver peroxisomes catalyze the β-oxidation of fatty acids. J.Biol.Chem.253, 1522,

Longo, G.P. und C.P. Longo (1970). Development of glyoxysomes in maize scutellum. Plant Physiol.46, 599-604.

Longo, C.P., (1968). Evidence of de novo synthesis of isocitratase and malatsynthetase in germinating peanut cotyledons. Plant Physiol.43, 660.666.

Longo, C.P. und C.P.Longo (1970). The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. Plant Physiol.45, 249-254.

Longo, G.P. und C.P.Longo (1975). Development of mitochondrial enzyme activities in germinating maize scutellum. Plant Sci.Lett.5, 339-346.

Longo, G.P., E.Bernasconi und C.P.Longo (1975). Solubilization of enzymes from glyoxysomes of maize scutellum. Plant Sci.Lett.55, 1115-1119.

Lord, J.M. und L.Bowden (1978). Evidence that glyoxysomal malate synthase is segregated by the ER in castor bean endosperm. Plant Physiol.61, 266-270.

Lord, J.M., T.Kagawa und H.Beevers (1973). Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. J.Cell Biol.57, 659-667.

Lowry, O.H., N.J.Rosebrough, A.L.Farr und R.J.Randell (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem.193, 265-275.

Lück, H., (1965). In: "Methods of Enzymatic Analysis". (es.H.U.Bergmeyer) p.885. Academic Press New York.

Mariott, K.M. und D.H.Northcote (1975). The induction of enzyme activity in endosperm of germinating castor bean endosperm. Biochem.J.152, 65-70.

Middleton, B., (1973). The oxoacyl - Coenzym A thiolases of animal tissues. Biochem.J.132, 717.

Miernyk, J.A., R.N.Trelease und J.S.Choinski (1979). Malatesynthase activity in cotton and other ungerminated oilseeds. Plant Physiol.63, 1068-1071.

Muto, S. und H.Beevers (1974). Lipase activities in castor bean endosperm during germination. Plant Physiol.54, 23-28.

Näher, G. (1970). "Lipase:Titrimetrische Messung" in "Methoden der enzymatischen Analyse I" (ed.Bergmeyer) p.781-786, Verlag Chemie Weinheim/Bergstr.

Ochoa, S. (1955). Malic denydrogenase from pig heart. In: "Methods in Enzymologie" Vol.I. (ed.S.P.Colowick und N.O.Kaplan) p.735, Academic Press New York.

Oputa, F.I. (1975). Lipase activity in germinating seedlings of cucumeropsis edulis. J.Exp.Bot.26, 379-386.

Ory, R.L., A.J.St.Angelo und A.M.Altschul (1960). Castor bean lipase: action on its endogenous substrate. J.Lipids Res.1, 208-213.

Ory, R.L., A.J.St.Angelo und A.M.Altschul (1962). The acid lipase of castor beans. Properties and substrate specifity. J.Lipid Res.3, 99-105.

Ory, R.L., L.Y.Yatsu und H.W.Kirchner (1968). Association of lipase activity with the spherosomes of ricinus communis. Arch.Biochem.Biophys.123, 255.

Ory, R.L., A.J.St.Angelo und A.M.Altschul (1969). Acid lipase of castor bean. Lipids 4, 177.

Ory, R.L. und A.J.St.Angelo (1971). Lipolysis in castor bean seeds: a reinvestigation of the neutral lipase. Lipids 6, 54.

Overath, P., E.M.Raufuss, W.Staffel und W.Ecker (1967). The induction of enzymes of fatty acid degradation.Biochem.Biophys. Res.Comm. 29, 28-33.

Patton, J.S. und M.C.Carey (1979). Watching fat digestion. The information of visible product phases by pancreatic lipase is described. Science 204, 145-148.

Racker, E., (1950). Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. Biochem.Biophys. Acta 4, 211-214.

Robbi, M. und P.B.Lazarow (1978). Synthesis of catalase in two cell-free protein-synthesizing systems and in rat liver. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75, 4344-4348.

Rosnitschek, I., (1977). Untersuchungen über Regulation, intrazelluläre Lokalisation und Eigenschaften der Lipase in den Kotyledonen von Rapskeimlingen (Brassica napus). Dissertationsarbeit, Botanisches Institut München.

Rosnitschek, I. und R.R.Theimer (1980). Properties of a membrane - bound triglyceridlipase of rapeseed (Brassica napus L) cotyledons. Planta 148, 193-198.

Sadar, M.H. und G.Ayranci (1978). Transient-phase and steady-state kinetics of lipase-catalyzed ester hydrolysis. J.Environ. Sci.Health, B 13 (2), 117-129.

Sanders, T.H. und H.E.Pattee (1975). Peanut alkaline lipase. Lipids 10, 50-54.

Schmid-Neuhaus, B. (1978). Untersuchungen zum Mechanismus der Funktionsänderung von Microbodies in den belichteten Kotyledonen von Sonnenblumenkeimlingen (Helianthus annuus L.) Dissertationsarbeit, Botanisches Institut München.

Schnarrenberger, C., A.Oeser und N.E.Tolbert (1971). Development of microbodies in sunflower cotyledons and castor bean endosperm during germination. Plant Physiol. 48, 566-574.

Schopfer, P., D.Bajracharya, R.Bergfeld und H.Falk (1976).Phytochrome -mediated transformation of glyoxysomes into peroxisomes in the cotyledons of mustard (Sinapis alba L) seedlings. Planta 133, 73-80.

Schousboe, I., Triacylglycerol lipase activity in baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae). Biochem.Biophys.Acta 434, 366-375.

Scow, R.O., P.Desnuelle und R.Verger (1979). Lipolysis and lipid movement in a membrane model. Action of lipoprotein lipase. J. Biol.Chem.254, 6456-6463.

Singer, T.P. (1948). On the mechanism of the enzyme inhibition by sulfhydryl reagents. J.Biol.Chem.174, 11-21.

Stumpf, P.K., (1976). Lipid metabilism. In: Plant biochemistry, p.427-461. (ed.J.Bonner, J.E.Varner). Academic Press New York.

Theimer, R.R., (1976).A specific inactivator of glyoxysomal isocitrate lyase from sunflower (Helianthus annuus L.) cotyledons. FEBS Lett.62, 297-300.

Theimer, R.R., G.Anding und B.Schmid-Neuhaus (1975). Density labeling evidence against a de novo formation of peroxisomes during greening of fat-storing cotyledons. FEBS Lett.57, 89-92.

Theimer, R.R., G.Anding und P.Matzner (1976). Kinetin action on the development of microbody enzymes in sunflower cotyledons in the dark. Planta 128, 41-47.

Theimer, R.R. und H.Beevers (1970). Oxidative activities of glyoxysomes. Plant Physiol 46, 38.

Theimer, R.R. und R.Schuster (1978). Light-dependent inhibition of germination and early seedling development of Borago officinalis. Z.Pflanzenphysiol.90, 111-118.

Theimer, R.R. und Rosnitschek (1978). Development and intracellulär localization of lipase activity in rapeseed cotyledons. Planta 139, 245-256.

Tolbert, N.E., R.K.Yamazaki und A.Oeser(1970). Localization and properties of hydroxypyruvate reductase in spinach leaf particles. J.Biol.Chem. 245, 5129-5136.

Tolbert, N.E.(1971) Microbodies - peroxisomes and glyoxysomes. Ann.Rev.Plant Physiol. 22, 45-74.

Trelease, R.N., W.M.Becker und J.J.Burke (1974). Cytochemical localization of malate synthase in glyoxysomes. J.Cell Biol. 60, 483-495.

Vigil, E.L. (1970). Cytochemical and development changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm, J.Cell Biol. 46, 435-454.

Walk, R.A. und B.Hock (1977). Glyoxysomal malate dehydrogenase of watermelon cotyledons: de novo synthesis on cytoplasmic ribosomes. Planta 134, 277-285.

Wanner, G., (1977). Feinstrukturelle und physiologische Untersuchungen zur Steuerung von Entwicklung und Differenzierung der Sphärosomen und Microbodies in eukaryontischen Pflanzenzellen. Dissertation, Botanisches Institut München.

Wanner, G. und R.R.Theimer (1978). Membranous appendices of sphärosomes. Possible role in fat utilization in germinating oil seeds. Planta 140, 163-169.

Yamazaki, R.K. und N.E.Tolbert (1970). Enzymic characterization of leaf peroxysomes. J.Biol.Chem.245, 5137-5144.

Zimmermann, R. und W.Neupert (1980). Biogenesis of glyoxysomes. Synthesis and intracellulär transfer of isocitrate lyase. Eur.J.Biochem.112, 225-233.

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität München unter der Leitung von Prof.Dr.R.R.Theimer angefertigt.

Herrn Prof.Dr.R.R.Theimer möchte ich hiermit für seine vielseitigen Anregungen und wertvollen Hinweise während der Experimente herzlich danken.

Frl. Ch. Mayer danke ich für die sorgfältige und gewissenhafte Assistenz bei einem Teil der Versuche, Herrn Söllner für die Anfertigung der Abbildungen.

Besonderer Dank gilt meiner Freundin für die Niederschrift dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern am Botanischen Institut.

Lebenslauf

1951	geboren in Vilsbiburg am 10. März
1957-1962	Volksschule in Vilsbiburg
1962-1971	Humanistisches Hans-Carossa-Gymnasium in Landshut
1971	Beginn des Biologie- und Chemiestudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1975	Anfertigung der Zulassungsarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer
1976	Staatsexamen in Biologie und Chemie
1977	Beginn der Dissertationsarbeit bei Prof.Dr.R.R.Theimer

Zur Zeit bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl Pflanzenphysiologie der Universität Bayreuth bei Prof.Dr.E.Beck beschäftigt.